Análisis de lípidos de biomembranas
Curso Práctico

Joaquín V. Rodriguez Ed.

UNR Editora

Análisis de lípidos de biomembranas
Curso Práctico

Análisis de lípidos de biomembranas
Curso Práctico

Joaquín V. Rodríguez
Editor Científico

Joaquín Rodríguez
Análisis de lípidos de biomembranas. Curso práctico - 1ª ed. - Rosario: UNR Editora - Universidad Nacional de Rosario, 2008.
150 p.; 26x18 cm.

ISBN 978-950-673-663-7

1. Bioquímica. 2. Lípidos. I. Título
CDD 612

Diseño de tapa: Julia Rodríguez y Jimena Rodríguez
Diseño interior: UNR Editora

ISBN 978-950-673-663-7

REUN
RED DE EDITORIALES DE UNIVERSIDADES NACIONALES

EDITORIALES DE LA A.U.G.M.
ASOCIACION DE UNIVERSIDADES GRUPO MONTEVIDEO

UNESCO

IMPRESO EN LA ARGENTINA - PRINTED IN ARGENTINA
UNR EDITORA - EDITORIAL DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO
SECRETARÍA DE EXTENSIÓN UNIVERSITARIA

Autores

Joaquín V. Rodríguez
Doctor en Bioquímica, Profesor Adjunto de Farmacología de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR. Investigador Independiente del CONICET.
email: jrodrig@fbioyf.unr.edu.ar

Raquel M. Cravero
Doctora en Bioquímica, Profesora Adjunta de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas UNR. Investigadora Adjunta del CONICET.
email: rcravero@fbioyf.unr.edu.ar

Carla Gallo
M.Sc. en Biología, Profesor Principal de Bioquimíca, Biología Molecular y Farmacología, Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia.
email: galloc@upch.edu.pe

Mónica Hourcade
Bioquímica, a cargo del Servicio de Cromatografía Gaseosa acoplada a Espectrometría de Masas de la Facultad de Ciencias. Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR.
email: mhourcad@fbioyf.unr.edu.ar

María E. Mamprin
Doctora en Ciencias Biológicas, Jefe de Trabajos Prácticos de Farmacología, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR. Investigadora Adjunta del CONICET.
email: mmamprin@fbioyf.unr.edu.ar

José M. Pellegrino
Bioquímico, docente de Fisiología de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR. Profesional Principal del CONICET.
email: jpellegr@fbioyf.unr.edu.ar

Giovanni Poletti
Licenciado en Biología, Profesor Auxiliar de Bioquímica, Biología Molecular y Farmacología, Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia.
email: polettig@upch.edu.pe

Nelson G. Stürtz
Doctor en Ciencias Biológicas, Jefe de Trabajos Prácticos de Toxicología, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR.
email: nsturtz@fbioyf.unr.edu.ar

Prólogo

En los años recientes, la bioquímica de lípidos de membranas ha tenido un crecimiento enorme en la literatura científica, sin embargo han aparecido muy pocos libros que enfoquen la metodología analítica en una forma que integre todas las etapas del análisis.Tampoco se han publicado textos en español que cubran en profundidad esta analítica y que puedan utilizarse para enseñar a estudiantes principiantes en la analítica de lípidos. Teniendo estas consideraciones en mente y con la experiencia obtenida durante el desarrollo del curso de postgrado «Análisis de lípidos de biomembranas» es que hemos escrito este libro. El texto ha sido pensado como un libro introductorio al análisis de lípidos de biomembranas para estudiantes de postgrado de Biología, Bioquímica, Biología Molecular y otras carreras afines.

En el texto se ha priorizado el desarrollo experimental de la metodología analítica de lípidos de biomembranas en etapas obviando revisiones de la literatura. En cada etapa del análisis se presenta una breve introducción para luego desarrollar un método seleccionado por los autores; en cada capítulo se incluye un experimento con sus resultados esperados obtenidos de experimentos realizados por estudiantes del curso. Se agregaron además notas adicionales con algunas técnicas y datos útiles para el analista.

Se han seleccionado técnicas simples y económicas que bastan para obtener información suficiente sobre la membrana del eritrocito y otros tejidos y membranas de origen natural. Se ha seleccionado como técnica separativa la cromatografía en capa fina que permite visualizar resultados con una inversión en equipamiento muy económica. Los lectores deben considerar que éste es un libro de texto introductorio al análisis de lípidos de biomembranas, que existen técnicas más potentes y sofisticadas como el NMR, la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas y la cromatografía de alta performance acoplada a la espectrometría de masas cuyo aprendizaje y utilización merecen tratamientos particulares por su complejidad y extensión y escapan a esta publicación. Han colaborado docentes de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad Nacional de Rosario que participan del dictado del curso. Se destaca la participación de Carla Gallo y Giovanni Poletti de la Facultad de Ciencias y Filosofía de la Universidad Peruana Cayetano Heredia quienes en sus estadías en nuestro laboratorio desarrollaron y mejoraron algunas de las metodologías que se describen en el texto.

Rosario, marzo de 2008, Argentina — Joaquín V. Rodríguez

Contenido

Agradecimientos

A Bruno Gazzin

A Giancarlo Lunazzi

A Claudio Tiribelli

Quienes en el Departamento de Bioquímica y Biofísica de la Macromolécula (DBBCM) de la Universidad de Trieste, Italia, nos brindaron sus enseñanzas, su constante apoyo, su afecto y amistad que posibilitaron la realización de este libro.

Este libro fue financiado con el subsidio de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica de Argentina (ANPCyT) PICT-03-14492 BID 1728 OC/AR.

Este libro es dedicado a Zaida Penton, a Shirley Ainsworth y al personal de la Biblioteca del Centro Virtual de Biotecnología para las Américas de la Universidad Autónoma de Méjico, cuya entusiasta y desinteresada colaboración hicieron posible su realización.

Abreviaturas

AcH: ácido acético
AG: ácidos grasos
AGL: ácidos grasos libres
AGME: metil ésteres de ácidos grasos
BHT: butil hidroxiltolueno
Cl_3CH: cloroformo
CE: cerebrósidos
CO: colesterol
CO-E: ésteres de colesterol
CL: cardiolipina
DG: diacilglicéridos
DPG: difosfatidilglicerol
EFS: extracción de fase sólida
ELL: extracción líquido-líquido
EtOH: etanol
GL: glicerol
GC: cromatografía de gas
GCMS: cromatografía de gas-masa
GLP: glicolípidos
GN: gangliósidos
HPLC: cromatografía líquida de alta performance
HPTLC: TLC de alta performance
LPA: ácido lisofosfatídico
LPC: lisofosfatidilcolina
LPE: lisofosfatidiletanolamina
LPS: lisofosfatidilserina
MetOH: metanol
MG: monoacilglicéridos
MGDG: monogalactosil diacilglicerol
DGDG: digalactosil diacilglicerol
PA: ácido fosfatídico
PC: fosfatidilcolina
PE: fosfatidiletanolamina
PG: fosfatidilglicerol
PI: fosfatidilinositol
PL: fosfolípidos
PS: fosfatidilserina
PM: plasmalógeno
PUFA: ác. grasos poliinsaturados
RPTLC: TLC en fase reversa
SF: sulfátidos
SM: esfingomielina
TG: triacilglicérido
TLC: cromatografía en capa fina

Recomendaciones a los lectores

Todos los procedimientos descritos y sus cantidades han sido probados y usadas en los laboratorios de los autores (CG, GP. JR, MEM, RC Y JP), sin embargo sugerimos a cada lector que cuando reproduzca los experimentos descritos tenga en cuenta lo siguiente:

1. Los materiales, equipos y reactivos son distintos en cada laboratorio, debido a que pueden ser de otra marca de fabricante con distintas especificaciones.

2. Cada laboratorio tiene que poner a punto los métodos antes de usarlos para sus experimentos y/o investigaciones de modo que éstos se adecuen a las muestras experimentales, condiciones de trabajo, caracteristicas de reactivos, instrumentos y la habilidad del usuario.

3. Las proporciones de los reactivos no deben ser cambiados, ni el orden de su uso.

4. Debe prestar la debida atención con el manejo de estos reactivos ya que son extremadamente tóxicos, inflamables y explosivos cuando se manipulan incorrectamente o mezclan en proporciones no adecuadas o en órdenes distintos. LEA TODOS LOS DOCUMENTOS DE SEGURIDAD DE MANEJO DE SUSTANCIAS QUE SEAN RELEVANTES A LOS PRODUCTOS QUE USARÁ ANTES DE INICIAR UN PROCEDIMIENTO.

5. Los puntos establecidos en las curvas de calibración de métodos son referenciales para el lector (esos valores se usan como se menciona anteriormente en los laboratorios de los autores) sin embargo usted puede necesitar modificar los puntos de la curva para determinar que los valores de sus muestras se encuentren dentro de los de la curva de calibración. Verifique si existe lógica en los valores calculados de los analitos obtenidos y los valores esperados y/o informados por otros autores.

Capítulo1

Lípidos de biomembranas

Carla Gallo, Raquel M. Cravero y Joaquín V. Rodríguez

Consideraciones generales sobre lípidos

Al presente no hay una definición del término lípido que sea aceptada universalmente, en general se describe a los lípidos como sustancias de origen natural que son solubles en solventes orgánicos como el Cl_3CH, éter dietílico, hexanos y alcoholes. Este concepto excluiría a los compuestos producidos por síntesis y a otros compuestos (esteroides, carotenoides, terpenos y ácidos biliares) que también son reconocidos como lípidos. Christie [1] ha propuesto una definición de lípidos:

Los lípidos son ácidos grasos y sus derivados y aquellas sustancias relacionadas biosintéticamente o funcionalmente a esos compuestos.

Por otra parte en el libro «A lipid glossary»[2], se propone una definición de lípidos bastante aproximada a la de Christie:

Los lípidos son compuestos basados en ácidos grasos o sustancias relacionadas con los mismos como los correspondientes alcoholes o las bases de esfingosina.

Esta definición incluye la mayor parte de los grupos de compuestos generalmente reconocidos como lípidos. Para tener una idea del amplio grupo de compuestos que comprende esta definición, veamos qué sustancias incluye:

Los ácidos grasos (AG), alcoholes y aldehídos se presentan naturalmente en forma combinada. A menudo se encuentran como ésteres y forman amidas en los esfingolípidos. Los AG se encuentran unidos al glicerol formando mono, di y triacilglicéridos o en combinación con una unidad estructural adicional formando los fosfolípidos, glicosidiacilgliceroles y los éter-lípidos. Los AG pueden estar esterificados con esteroles (ésteres de esteroles) y con alcoholes de cadena larga (ceras) en lugar del glicerol.

Existe otra forma de clasificar a los lípidos que es aplicable en la separación cromatográfica de los mismos:

Lípidos simples: son aquellos cuya hidrólisis produce al máximo dos tipos de productos primarios por mol. Ejemplo triacilglicéridos (TG), esteroles (colesterol) y ésteres de esteroles.

Lípidos complejos: son aquellos cuya hidrólisis produce tres o más productos primarios por mol. Ejemplo: fosfolípidos (FL) y glicolípidos (GL).

Una forma adicional de clasificarlos es como lípidos neutros y polares:

Lípidos neutros: son aquellos lípidos que no poseen átomos cargados. Ejemplo: TG, esteroles (colesterol) y ésteres de esteroles (sinónimo de lípidos simples).

Lípidos polares: son aquellos lípidos que poseen grupos polares o cargados (PO_4^{3-}, SO_4^{2-}, etc). Ejemplo: FL, GL, etc. (sinónimo de lípidos complejos).

Veamos ahora una clasificación de lípidos neutros y polares provenientes de tejidos animales y de plantas:

Lípidos neutros

1. mono, di y triacilgliceroles.
2. ácidos grasos libres y metil ésteres de AG.
3. colesterol y ésteres de colesterol.
4. alcoholes provenientes de AG.
5. ceras (ésteres de alcoholes de cadena larga y AG).

Lípidos polares

1. fosfolípidos acídicos:
    1. ácido fosfatídico.
    2. fosfatidilglicerol.
    3. difosfatidilglicerol (cardiolipina).
2. fosfolípidos:
    1. fosfatidilcolina y lisofosfatidilcolina.
    2. fosfatidiletanolamina y lisofosfatidiletanolamina.
    3. fosfatidilserina y lisofosfatidilserina.
    4. fosfatidilinositol.
    5. fosfonolípidos.
3. glicolípidos:
    1. monogalactosil diacilglicerol.
    2. digalactosil diacilglicerol.
4. esfingolípidos
    1 esfingomielina y otros.
    2 ceramidas.
    3 monoglicosilceramidas (cerebrósidos).
    4 di, tri y tertraglicosilceramidas (globósidos y fucósidos).
    5 sulfátidos.

Todos los lípidos polares son de naturaleza anfipática, es decir, su estructura contiene una región polar y otra no polar. Son también anfipáticos algunos lípidos neutros como el colesterol libre y los ácidos grasos libres, debido a que contienen grupos polares pequeños (-OH y –COOH, respectivamente) en su estructura.

Lípidos de Biomembranas

Las membranas biológicas son agregados de moléculas, las cuales se organizan en forma de láminas cerradas, separando compartimientos acuosos. Los componentes mayoritarios de las membranas biológicas son lípidos y proteínas, otros constituyentes minoritarios son azúcares, iones y agua.

La mayoría de los lípidos que forman las membranas biológicas son de naturaleza anfipática. Estas moléculas presentan una región polar (llamada también cabeza polar) y una región hidrofóbica alargada (denominada cola hidrofóbica), las cuales en conjunto determinan una geometría espacial cilíndrica, ver figura 1.

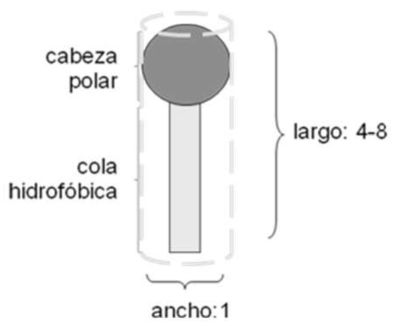


Fig. 1. Los lípidos de membrana son un grupo de moléculas anfipáticas que presentan la particularidad de ser más largas que anchas, en una proporción que puede variar entre 4:1 y 8:1.

La distribución de polaridad y la geometría espacial de estos lípidos son las propiedades que determinan la estructura tridimensional de las membranas biológicas. En el medio acuoso de los seres vivos, los lípidos se agregan por medio de interacciones hidrofóbicas, exponiendo su zona polar al medio acuoso, y ocultando su zona no polar de éste, formando la estructura de bicapa, ver figura 2.

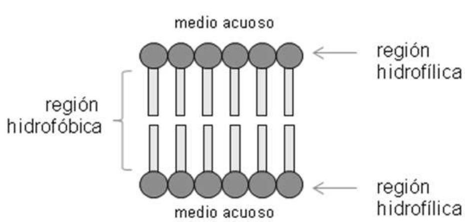


Fig. 2. Bicapa de lípidos anfipáticos.

La composición química de la cabeza polar y la cola hidrofóbica de los lípidos en las membranas biológicas es variada. Sin embargo, en la mayoría de lípidos de membrana, la cabeza polar contiene un grupo fosfato, y la cola hidrofóbica 2 cadenas hidrocarbonadas, que generalmente son ácidos grasos.

Si bien la mayoría de los lípidos de membrana presentan una geometría espacial cilíndrica, existen lípidos minoritarios con geometría cónica, como la

fosfatidiletanolamina que tiene una cabeza polar pequeña, o como los lisofosfolípidos, que al tener una sola cola hidrofóbica tienen una geometría espacial de cono invertido. Los lípidos con geometría cónica participan en la formación de curvaturas en las membranas (ver figura 3)[4,5].

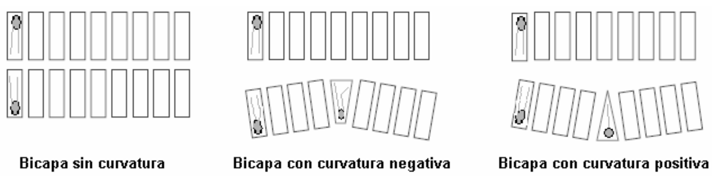


Fig. 3. Geometría de los lípidos de membrana y formación de curvaturas. Modificado de: Escribá PV. Membrane-lipid therapy: a new approach in molecular medicine. Trends in Molecular Medicine. 12(1): 34-43. 2006.

Las bicapas de lípidos que conforman las membranas son agregados moleculares ordenados (mantienen un arreglo tridimensional) y a la vez fluidos (las moléculas tienen libertad de movimiento). El movimiento browniano hace posible que los lípidos formadores de bicapa puedan movilizarse sobre el plano de cada monocapa, y también la rotación de sus cadenas hidrocarbonadas. La libertad de movimiento de las moléculas en la bicapa, determina la fluidez de ésta. La fluidez de las membranas es modulada por las propiedades estructurales de las cadenas hidrocarbonadas (por ejemplo longitud, presencia de dobles enlaces) y de las cabezas polares de los propios lípidos formadores de bicapa (p.ej. capacidad de formar puentes de hidrógeno o de generar interacciones electrostáticas con iones presentes en el medio acuoso)[6,7].

Los esteroles son un grupo lípidos de membrana que presentan una región no polar voluminosa y rígida que termina en una cola hidrocarbonada, y una cabeza polar pequeña. Estas moléculas se intercalan con los lípidos formadores de bicapa en las membranas, modulando su fluidez, principalmente mediante su interacción con las colas hidrocarbonadas (ver figura 4)[8]. Existen esteroles propios de células animales (colesterol) y vegetales (fitosteroles). Los esteroles presentan afinidad diferencial con diferentes lípidos de membrana; esto determina la formación de dominios de lípidos (llamados también microdominios) dentro de cada plano de la bicapa[4,9].

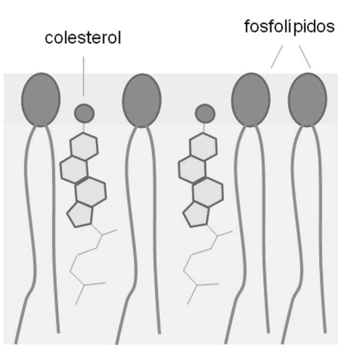


Fig. 4. Interacción entre el colesterol y los fosfolípidos en la membrana de una célula animal. Modificado de: Maxfield FR, Taba I. Role of cholesterol and lipid organization in disease. Nature. 438 (1): 612-619. 2005.

Las membranas biológicas se encuentran tanto en virus (virus de cubierta), como en bacterias, y en las células de plantas y animales. Si bien muchas especies de lípidos de membrana son comunes a organismos muy diversos, también se pueden observar especies particulares en diferentes grupos de organismos, como por ejemplo los fitanilgliceroles que son propios de las archaeobacterias. Tanto los virus de cubierta como ciertas bacterias presentan una bicapa única, mientras que las células de plantas y animales presentan un sistema interno de membranas que comprende a las estructuras llamadas organelas (por ejemplo núcleo, retículo endoplásmico, mitocondria, cloroplasto, lisosoma, peroxisoma, etc.). El sistema de endomembranas conforma alrededor del 90 % del total de superficie de membrana de la célula[6].

La composición de lípidos es distinta en las diferentes membranas de un mismo organismo. En la mayor parte de casos, los lípidos que componen las diferentes membranas son los mismos pero su proporción relativa varía (ver figura 5).

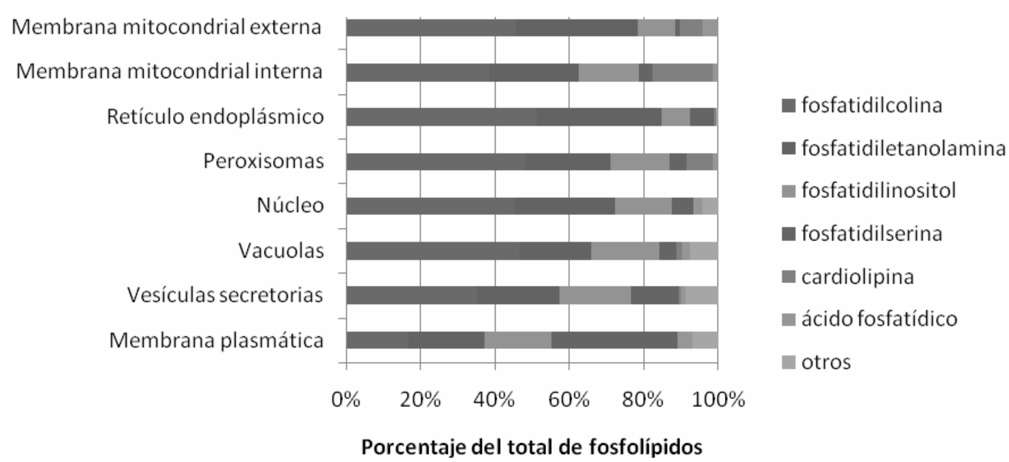


Fig. 5. Composición de fosfolípidos la membrana plasmática y de las organelas de levadura (*Saccharomyces cerevisae*). Diseño tomado de: Nelson DL & Cox MM. Lehninger Principles of Biochemistry. 4th Edition. 2005. WH Freeman. Datos experimentales tomados de: Zinser E et al. 1991. Phospholipid Synthesis and Lipid Composition of Subcellular Membranes in the Unicellular Eukaryote *Saccharomyces cerevisiae*. J Bacteriol. 173(6): 2026-2034.

Es posible encontrar también algunos lípidos no anfipáticos en las membranas biológicas, pero a diferencia de los lípidos anfipáticos, éstos se encuentran en pequeñas cantidades, y debido a su naturaleza físicoquímica, no tienen capacidad de ordenarse en forma de bicapa. En las membranas los lípidos no anfipáticos se encuentran alojados en la interfaz hidrofóbica entre monocapas (ver figura 6).

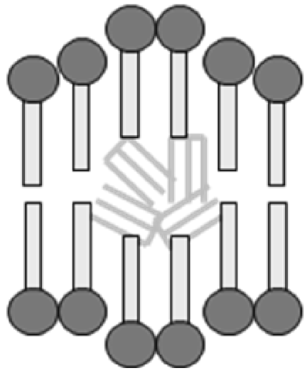


Fig. 6. Triacilglicéridos en una bicapa

Estructuralmente, existen tres grupos principales de lípidos de membrana: los glicerolípidos, los esfingolípidos y los esteroles. A continuación listamos las especies de lípidos de estos tres grupos que se encuentran con mayor frecuencia en las membranas biológicas:

Glicerolípidos: fosfatidilcolinas (PC), fosfatidiletanolaminas (PE), fosfa-tidilserinas (PS), fosfatidilinositoles (PI), mono y digalactosil diacilgliceroles (MGDG, DGDG).

Esfingolípidos: esfingomielina (SM)

Esteroles: colesterol y fitosteroles

La mayoría de los lípidos de membranas provienen de la molécula de glicerol (Figura 7), una estructura simple de tres atómos de carbono que contiene un grupo hidroxilo en cada carbono. En estas moléculas, denominadas glicerolípidos, dos grupos hidroxilos son reemplazados por ácidos grasos de cadenas largas (ácido palmítico, esteárico, etc.) y la tercer posición es reemplazada por un grupo polar (ejemplo: fosfato).

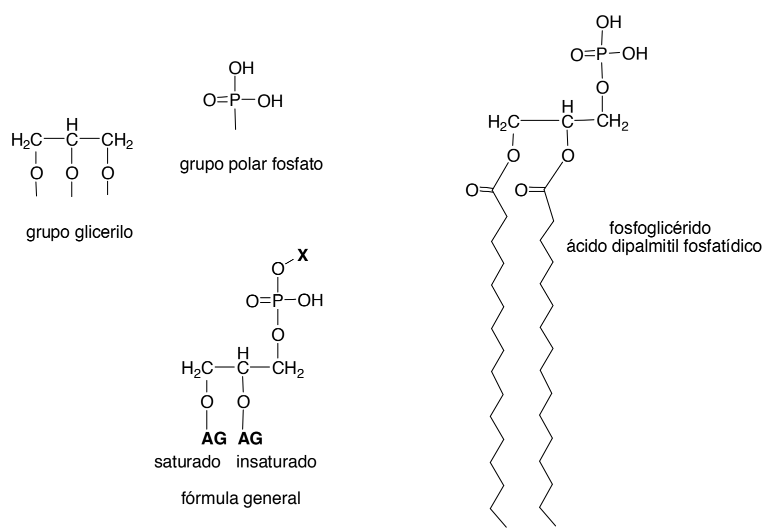
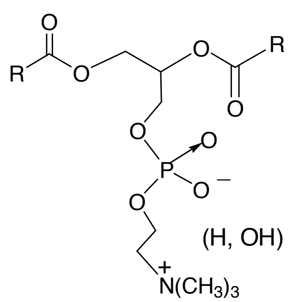
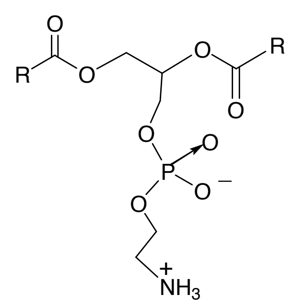


Fig 7. Estructura general de fosfolípidos.

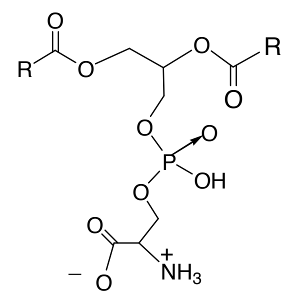
Los glicerolípidos difieren entre ellos tanto en las identidades de los ácidos grasos contenidos en la molécula como en la del grupo polar. Por lo general los glicerolípidos contienen un AG saturado y uno insaturado, este último en el carbono medio del glicerol (hay excepciones a este arreglo, como es el caso de la membrana alveolar en pulmón, en la que los dos AG son saturados). Los grupos polares de los glicerolípidos también varían, la mayor parte de ellos contienen fosfato al que se le adicionan otros grupos como la colina y aminas de estructura similar (etanolamina), aminoácidos como la serina, o azúcares alcohol como el inositol, dando origen a los fosfolípidos: fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS) y fosfatidilinositol (PI) respectivamente (figura 8). Debido a la presencia de fosfato en su estructura molecular, a este grupo de glicerolípidos se les denomina glicerofosfolípidos o simplemente fosfolípidos.



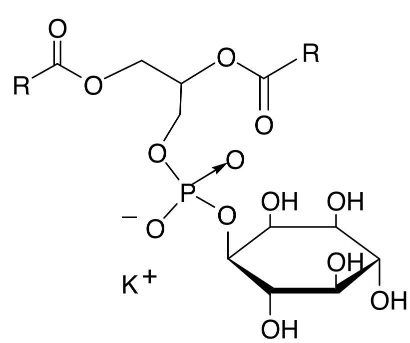
lecitina (fosfatidil colina)



fosfatidil etanolamina



fosfatidil serina

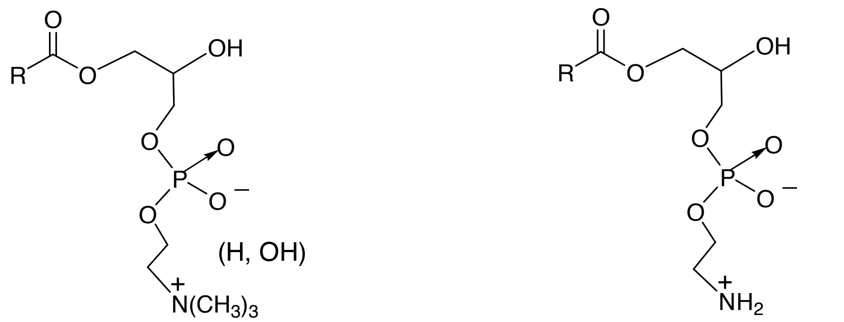


fosfatidil inositol

Fig. 8. Estructuras de fosfolípidos.

Por acción de enzimas que operan realizando hidrólisis selectiva de los enlaces éster en los fosfolípidos, pueden obtenerse lisofosfolípidos o fosforil éster o el ácido fosfatídico. Las fosfolipasas A_1 y A_2 hidrolizan los ésteres en

posición 1 y 2 de las moléculas de fosfolípido produciendo los lisofosfolípidos como la lisofosfatidilcolina (LPC), lisofosfatidiletanolamina (LPE), etc. (figura 10). La fosfolipasa C hidroliza el enlace fosfatidil éster para dar diacilglicerol y fosforil éster. En cambio la fosfolipasa D hidroliza la base y produce ácido fosfatídico y el alcohol correspondiente (ver figura 11).



lisofosfatidil colina   lisofosfatidil etanolamina

Fig.10. Estructuras de lisofosfolípidos.

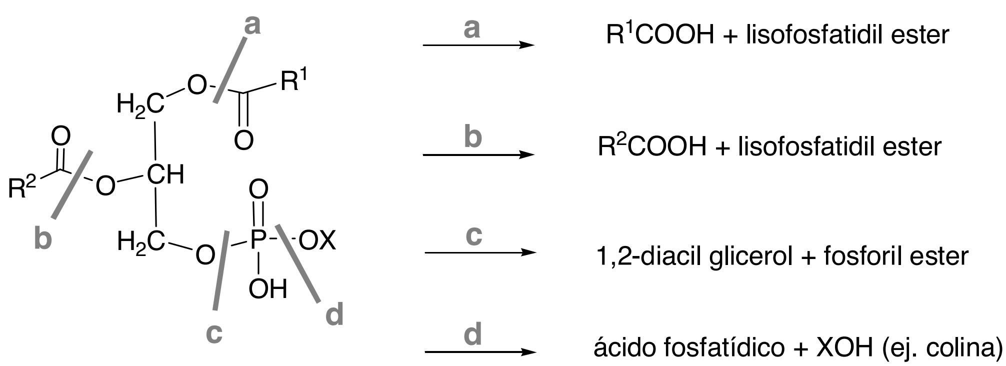


Fig.11. Sitios de hidrólisis de los glicerofosfolípidos por fosfolipasas.

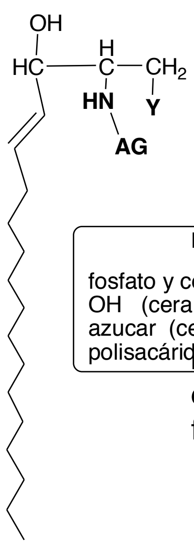
Es importante destacar que cada clase de fosfolípido de membrana presenta una variedad de AG asociados a ellos; por ejemplo, la fosfatidilcolina no es un compuesto, sino un grupo de compuestos que contiene el mismo grupo de fosfocolina pero diferentes cadenas de AG. Estos compuestos se conocen como especies moleculares de PC.

Las especies moleculares de una clase de lípido determinado, son moléculas individuales que difieren en el tipo o combinación de las cadenas acílicas. El número teórico de especies moleculares en una clase de lípido puede calcularse del número total de diferentes acilos presentes (n) y del número de grupos acilos en cada molécula (x) y es n^x *[2].*

La segunda clase de lípidos de membrana cuantitativamente importante son los esfingolípidos. La estructura básica de esta molécula es la esfingosina (figura 12). Esta molécula posee la estructura de los glicerolípidos con algunas diferencias: la primera cadena hidrocarbonada es siempre de 15 átomos de carbono con una doble ligadura en posición 1 (15:1), la diferencia es que está unida al glicerol por un enlace simple C-C, más que por un grupo éster como en los glicerolípidos, el glicerol retiene su hidroxilo. En el segundo carbono puede encontrarse un AG unido al glicerol por un enlace amida. El grupo polar puede contener un grupo fosfato más colina dando origen a la esfingomielina (SM), un grupo hidroxilo (origina las ceramidas), un azúcar simple (cerebrósidos) o un polisacárido complejo (gangliósidos).

Y
fosfato y colina =
esfingomielina
OH (ceramidas)

esfingomielina



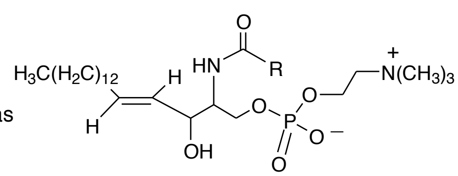
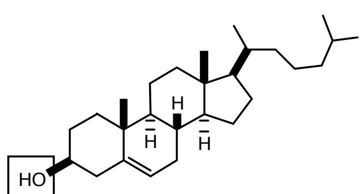


Fig.12. Estructuras de esfingosinas

Y
fosfato y colina = esfingomielina
OH (ceramidas)
azucar (cerebrósidos)
polisacárido (gangliósidos)

esfingomielina

El tercer grupo importante de lípidos de membrana está conformado por los esteroles. En la figura 13 se muestra la estructura del colesterol. Es importante destacar que los esteroles también pueden encontrarse esterificados con AG formando los ésteres de esteroles (ver otras estructuras de lípidos).



colesterol

Fig.13. Estructura del colesterol.

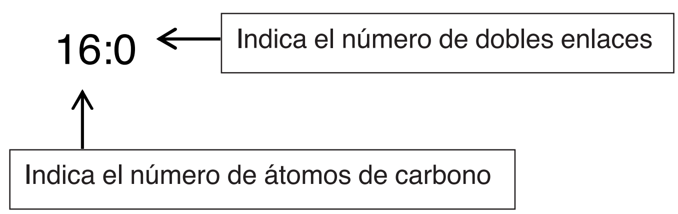
Los AG constituyentes de lípidos de membranas, son cadenas hidrocarbonadas largas que poseen un grupo terminal carboxilo y un metilo en el otro extremo.

Al presente han sido identificados más de 1000 AG provenientes de fuentes naturales. Respecto a los AG de origen animal, hay cinco de ellos que son los más abundantes: ácidos palmítico, esteárico, oleico, linoleico y araquidónico.

Los AG se identifican con un nombre trivial, un nombre sistemático y un identificador numérico. Como ejemplo veamos al ácido palmítico que es un AG de 16 átomos de carbono.

Nombre trivial: ácido palmítico Nombre sistemático: ácido hexadecanoico

Identificador numérico: 16:0, la clave del identificador numérico está dada por el significado de los dos números separados por los dos puntos:



Cuando en la molécula se presentan dobles enlaces es necesario indicar su posición, para ello al identificador numérico se le agrega el símbolo Δ seguido de un número que indica la localización del doble enlace contando la posición del carbono desde el carboxilo terminal del AG que es el carbono número 1.

Ejemplo ácido oleico 18:1Δ 9, que es un AG de 18 átomos de carbono con una doble ligadura en la posición 9. El ácido linoleico 18:2 Δ 9, 12, es un AG de 18 átomos de carbono con dos dobles enlaces en las posiciones 9 y 12.

Los AG pueden agruparse en familias de acuerdo al número de dobles enlaces en la molécula. Los AG sin dobles enlaces se llaman saturados y se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Ácidos grasos saturados comunes
Fórmula general $CH_3\text{-}(CH_2)_n\text{-}COOH$

Átomos de carbono en la cadena	Nombre sistemático	Nombre trivial
2	Etanoico	Acético
4	Butanoico	Butírico
6	Hexanoico	Caproico
8	Octanoico	Caprílico
10	Decanoico	Cáprico
12	Dodecanoico	Laúrico
14	Tetradecanoico	Mirístico
16	Hexadecanoico	Palmítico
18	Octadecanoico	Esteárico
20	Eicosanoico	Araquídico

Los AG que tienen un doble enlace en la molécula se denominan monoinsaturados y se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Ácidos grasos monoinsaturados.
Fórmula general $\mathbf{CH_3\text{-}(CH_2)_n\text{-}CH{=}CH\text{-}(CH_2)_m\text{-}COOH}$

Símbolo	Nombre trivial	Familia
16:1 Δ 9	Palmitoleico	n-7, ω-7
18:1 Δ 9	Oleico	n-9, ω-9
18:1 Δ 6	Petroselínico	n-12
18:1 Δ 11	Cis-vacénico	n-7
20:1 Δ 9	Gadoleico	n-11
20:1 Δ 11	Cetoleico	n-9
22:1 Δ 13	Erúcico	n-9

Aquellos AG con más de dos dobles enlaces se denominan poliinsaturados. Para los AG monoinsaturados a poliinsaturados se utiliza también otra clasificación conocida como omega (ω). El grupo ω se determina por el número de átomos de carbono entre el metilo terminal de la molécula y el doble enlace. Ejemplo si el doble enlace más cercano al metilo terminal se posiciona a 3 átomos de carbono, el AG se conoce como ω-3 o AG n-3. Este tipo de AG se encuentra en grandes cantidades en los peces. El ácido oleico en la clasificación ω es n-9.

Ac. oleico: 18:1 Δ 9 n-9

En las grasas provenientes de animales se encuentran cuatro familias ω de AG poliinsaturados, ellas se conocen como n-3, n-6, n-9 y n-7. Veamos entonces ejemplos de algunas familias de poliinsaturados:

n - 6

linoleico 18:2
γ linolénico 18:3
dihomo-γ-linolénico 20:3 Δ 8,11,14
araquidónico 20:4 Δ 5,8,11,14

Ac. araquidónico $\mathbf{CH_3\text{-}(CH_2)_4\text{-}(CH{=}CH\text{-}CH_2)_4\text{-}(CH_2)_2\text{-}COOH}$ **n-6 20:4**

n - 3

α-linoleico 18:3
Estearidónico 18:4
Eicosanopentaenoico (EPA) 20:5 Δ 5,8,11,14,17

Ac. Eicosanopentaenoico $\mathbf{CH_3\text{-}CH_2\text{-}(CH{=}CH\text{-}CH_2)_5\text{-}(CH_2)_2\text{-}COOH}$ **n-3 20:5**

Los AG ω-6 y ω-3 son denominados esenciales porque no pueden ser generados a partir de precursores en el sistema metabólico humano y deben entonces ser provistos por la dieta.

Existe una clasificación para los AG insaturados que está relacionada a la estereoquímica del doble enlace (en base a la disposición espacial de los átomos de H unidos al doble enlace). En la naturaleza la mayor parte de los AG tienen los átomos de H en los dobles enlaces en configuración *cis*, también puede ocurrir que se presenten en configuración *trans* como en el caso de los AG provenientes de los TG de las margarinas a consecuencias del proceso de fabricación[3]. La configuración *cis* introduce una curvatura en la molécula de AG, en cambio la configuración *trans* no, por ello la estructura tridimensional no es la misma. Los ácidos grasos con dobles enlaces *cis* favorecen las estructuras tridimensionales cónicas en los lípidos de membrana, y al ocupar más área tridimensional propician el movimiento molecular, incrementando la fluidez. Por el contrario, los ácidos grasos con dobles enlaces *trans* promueven estructuras tridimensionales cilíndricas en los lípidos de membrana, y favorecen el contacto entre moléculas vecinas, disminuyendo la fluidez (ver figura 14) y pueden ser responsables de las propiedades aterogénicas de los AG *trans*.

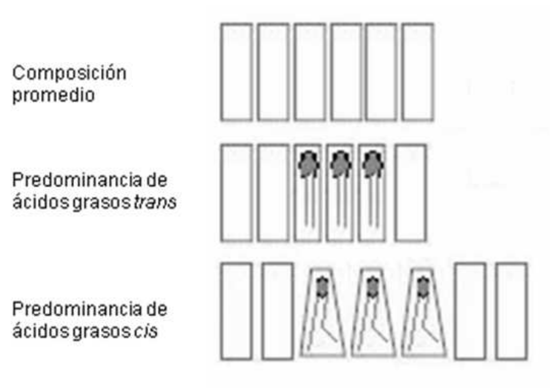


Fig. 14. Estructura tridimensional de los lípidos de membrana con ácidos grasos insaturados.

Roles de los lípidos en las membranas biológicas

Para comprender el rol de los lípidos en las membranas es necesario tener en cuenta que muchas de sus funciones biológicas están relacionadas a su interacción con las proteínas presentes en el ambiente de la membrana. En conjunto, lípidos y proteínas confieren las siguientes funciones a la célula: barrera permeable y selectiva para el paso de solutos, interfaz para la recepción de señales del medio extracelular y para la transducción de estas señales hacia el interior de la célula. En las organelas, lípidos y proteínas interactúan también para mediar el paso de solutos y de señales. En la membrana de ciertas organelas además, la interacción entre lípidos y proteínas permite la segregación de componentes que se van sintetizando, de tal forma que la composición de

las distintas estructuras subcelulares se preserva durante el ciclo de vida de la célula.

Las proteínas de membrana se organizan topológicamente en la bicapa lipídica de acuerdo a las características de los grupos R de sus aminoácidos. Los grupos polares generalmente se encontrarán dirigidos hacia los compartimientos acuosos (espacio intra y extra-celular, interior de canales iónicos o de transportadores de sustancias polares). Los grupos R no polares se encontrarán interactuando con la región no polar de la bicapa lipídica. Así, existen proteínas que interactúan únicamente con la región polar de los lípidos de membrana (proteínas periféricas) o proteínas que penetran o atraviesan la bicapa, formando parte de la estructura de la misma (proteínas integrales). Las proporciones de proteína/lípido varía enormemente entre diferentes membranas, por ejemplo en la membrana plasmática de las células de mielina (que rodean las fibras nerviosas) la proporción es de 1:9 y en la membrana mitocondrial externa de 1:1.

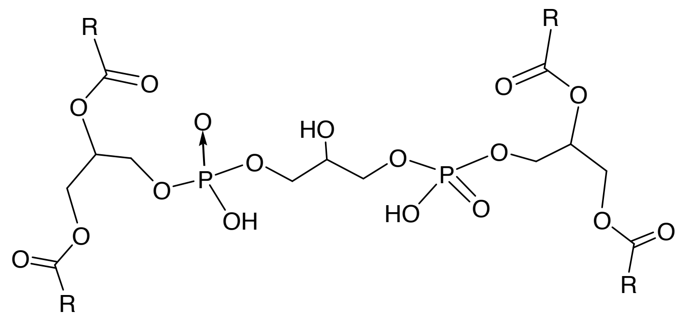
A continuación listamos las principales interacciones que ocurren entre lípidos y proteínas en las membranas:

- Algunas proteínas se encuentran unidas covalentemente a cadenas hidrocarbonadas (miristato, palmitato, farnesilo o geranil-geranilo –los dos últimos isoprenoides–) o a fosfolípidos como el glicosil-fosfatidil inositol. Esto permite que las proteínas se encuentren ancladas en la bicapa. La hidrólisis de la porción hidrocarbonada por enzimas intracelulares genera cambios conformacionales en la proteína, y permite modular la actividad de ésta[(7,10)].
- Los lípidos de membrana (principalmente fosfoinosítidos y diacilglicerol) pueden ser reconocidos por sitios de unión específicos presentes en las proteínas de membrana, tanto integrales como periféricas, o también por proteínas que conforman el citoesqueleto [(11,12)].
- El grosor y la curvatura de la bicapa pueden resultar de la interacción entre regiones polares y no polares de lípidos y proteínas, y la forma tridimensional de éstas moléculas[(4,5)].
- Los lípidos que forman parte estructural de la bicapa pueden ser convertidos en una amplia gama de intermediarios de señalización celular (10,12). Un ejemplo de esto es la acción de las fosfolipasas, descrita previamente en este capítulo.

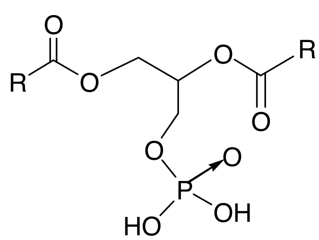
Los lípidos y las proteínas coexisten formando agregados en la bicapa. Estos agregados son denominados microdominios o balsas lipídicas, debido a que contienen una composición de lípidos y proteínas diferente al de la bicapa que los rodea. Sin embargo, la composición de estos microdominios no es estática: lípidos y proteínas son intercambiados hacia y fuera de los microdominios, con cursos temporales que van de fracciones de segundo a varias horas. Los microdominios, con diámetro promedio de varios cientos de nanómetros, esta-

rían involucrados en diversos procesos relacionados con la actividad de proteínas de membrana y la generación de señales celulares(4,7).

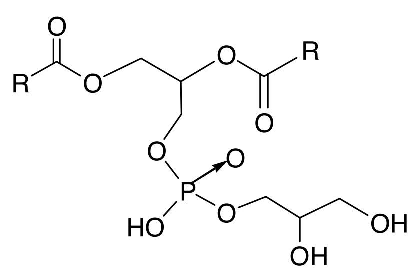
Otras estructuras de lípidos



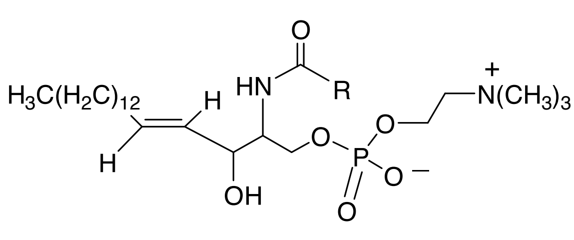
cardiolipina



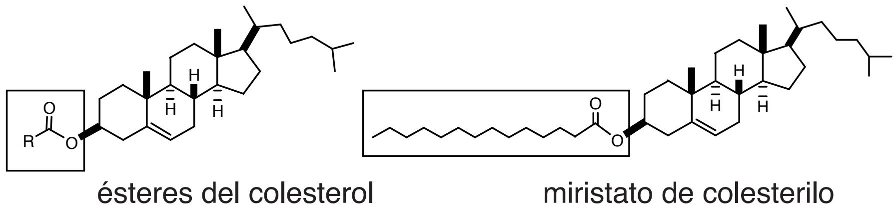
ácido fosfatídico



fosfatidil glicerol



esfingomielina



Referencias bibliográficas

1. CHRISTIE,W.W. Fatty acids and lipids in: Gas Chromatography and Lipids. A practical guide. Scotland, The Oily Press Ltd.; 1989:81-83.
2. GUNSTONE, F.D. and HERSLÖF, B.G. in A lipid glossary, Scotland, The Oily Press Ltd. 1992:11.
3. LAPOSATA, M. Fatty acids. Biochemistry to clinical significance. *Am.J.Clin.Pathol.* 1995; 104:172-179.
4. SPRONG, H., VAN DER SLUIJS, P., VAN MEER, G.. How proteins move lipids and lipids move proteins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2001; 2: 504-513.
5. ESCRIBÁ, P.V. Membrane-lipid therapy: a new approach in molecular medicine. *TRENDS in Molecular Medicine*. 2006; 12: 34-43.
6. LODISH, H., BERK, A., KAISER, C., KRIEGER, M., SCOTT, M., BRETSCHER, A., PLOEGH, H., MATSUDAIRA, P. in Biomembrane Structure. Molecular Cell Biology, 6ta Edición. W.H. Freeman Ed. 2008: 411-436.
7. VEREB, G., SZOLLOSI, J., MATKO, J., NAGY, P., FARKAS, T., VÝGH, L., MATYUS, L., WALDMANN, T.A., DAMJANOVICH, S. Dynamic, yet structured: The cell membrane three decades after the Singer–Nicolson model. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 2003;100: 8053-8058.
8. MAXFIELD, F.R., TABA, I. Role of cholesterol and lipid organization in disease. *Nature*. 2005; 438: 612-619.
9. MCKERSIE, B.D., THOMPSON, J.E. Influence of plant sterols on the phase properties of phospholipid bilayers. *Plant Physiol.* 1979; 63:802-805.
10. EYSTER, K.M. The membrane and lipids as integral participants in signal transduction: lipid signal transduction for the non-lipid biochemist. *Advan. Physiol. Educ.* 2007; 31:5-16.
11. HURLEY, J.H. Membrane binding domains. *Biochim. Biophys. Acta* 2006; 1761: 805–811.
12. FERNANDIS, A.Z., WENK, M.R. Membrane lipids as signaling molecules. *Curr. Opin. Lipidol.* 2007; 18:121-128.

NOTAS

Capítulo 2

Generalidades del trabajo con lípidos

Joaquín V. Rodríguez

El propósito del presente capítulo es introducir al estudiante en la práctica del trabajo en fase orgánica ya que generalmente durante el desarrollo de las carreras de Biología y Bioquímica la mayor parte de los experimentos se desarrollan en fase acuosa. El trabajo con lípidos requiere de especiales cuidados para realizar purificaciones de los extractos obtenidos de tejidos de animales, bacterias o plantas, sin contaminaciones, artefactos o pérdidas por oxidaciones no controladas. Veamos entonces algunas consideraciones con respecto a los materiales de laboratorio a utilizar durante el desarrollo del curso.

Material de vidrio

En todos los procedimientos que se desarrollarán durante el curso se utilizará material de vidrio ya que no es posible utilizar materiales plásticos porque los mismos contienen catalizadores como los ftalatos que son extraídos del plástico por los solventes orgánicos y producen contaminaciones y artefactos en las determinaciones posteriores. Los únicos polímeros sintéticos aptos para el trabajo con lípidos son el politetrafluoretileno (PTFE) y el polietileno rígido de alta densidad. El material de vidrio, tanto el material para medir volúmenes (probetas) o para contener (erlenmeyers) o realizar extracciones (ampollas de decantación) debe ser de buena calidad y preferentemente con tapones esmerilados para impedir la evaporación de los solventes. Los tubos utilizados para extracción deben ser robustos (pared gruesa) para poder ser centrifugados y tener tapón esmerilado o tapa a rosca con contratapa de PTFE o viton®, el volumen de extracto a contener dependerá del tipo de material a utilizar, generalmente para tejidos animales utilizamos tubos de 20 mL o más pequeños (10 mL). Cuando se almacenan muestras en viales con tapa hay que prestar especial atención al material de la contratapa y verificar su compatibilidad con solventes, en nuestra experiencia preferimos utilizar ampollas de vidrio neutro color caramelo las que se cierran en atmósfera de N_2, procedimiento que será descripto posteriormente.

Lavado del material de vidrio

El material de vidrio debe ser escrupulosamente lavado, cuando ha sido utilizado con extractos es necesario en primer lugar hacer lavados con pequeñas cantidades de solvente orgánico (Cl_3CH) para arrastrar el material adherido a las paredes, luego de evaporado el solvente lavar con detergente, si es posible sonicar a 60 °C para luego enjuagar con agua desmineralizada y dejar en HCl o HNO_3 al 10 % para destruir el detergente y obviar así las contaminaciones con fosfato. Para desengrasar puede utilizarse KOH en isopropanol (disolver 120 g KOH en 120 mL de H_2O, luego agregarlo a 1 L de isopropanol o EtOH) o mezcla sulfocrómica cuya receta puede encontrarse en el capítulo 5. Secar el material en estufa para eliminar la humedad. Las ampollas deben ser lavadas con agua destilada/bidestilada y secadas en estufa a 120 °C. En el caso de que no se disponga de material con tapa esmerilada, no se deben utilizar materiales como el Parafilm para cerrar tubos o vasos de precipitado porque se disuelve con lo vapores de los solventes y contamina las muestras, es preferible utilizar papel de aluminio o polietileno de alta densidad.

Agua destilada

En capítulo 5 se describe las calidades de agua de laboratorio a utilizar.

Material volumétrico

Durante el desarrollo del curso se utilizarán pipetas de vidrio y pipetas pasteur de vidrio descartables. Las primeras deben ser operadas usando las propipetas Oxford con el cuidado de no aspirar solventes dentro de la propipeta ya que de esa manera se contamina y debe ser descartada. Para medir volúmenes de extractos o stándard se utilizarán preferentemente microjeringas del tipo Hamilton y capilares calibrados del tipo Drummond de volumen fijo (1, 2, 5, 10, 20, 50 μL), éstos son descartables y su uso es óptimo, por ejemplo para tomar muestras de material radiactivo. Las microjeringas deben ser lavadas con solvente puro entre cada muestra y varias veces al final de su uso. En el caso de utilizar pipetas automáticas de desplazamiento positivo, utilizar tips plásticos monouso (hay que verificar su compatibilidad con solventes) y al usarlos deben estar el menor tiempo posible en contacto con las muestras.

Nitrógeno y otros gases inertes

El N_2 se utiliza para evaporar solventes de extractos y soluciones de lípidos por arrastre, es necesario que sea de la máxima pureza, cuando se dispone del gas de menor pureza de un 99%, puede ser necesario secarlo por pasaje a través de H_2SO_4 concentrado en un frasco lavador. Puede también colocarse un filtro de PTFE de 0.2 μm (del tipo usado para filtros de jeringas) en la tubería de salida del gas con el fin de retener partículas y microgotas provenientes del

interior del cilindro de gas. Es importante conocer el manejo y purgado de los manómetros reguladores. Para evaporar solventes se burbujea suavemente el N_2 en el extracto utilizando agujas de acero inoxidable (largo aproximado de 50 mm) conectadas a un manifold como el mostrado en la figura 1. Este sistema permite evaporar varias muestras en simultáneo mientras los tubos se colocan en un baño termostático o en baño seco a 40 °C. Las agujas deben ser lavadas por burbujeo en Cl_3CH o el solvente de las muestras. También el gas puede ser burbujeado en los tubos de extracción conectando las agujas de acero inoxidable a una cañería común obtenida de los equipos descartables para transfundir sangre, este sistema es más económico que el manifold, además utilizando conectores en Y de plástico se pueden conectar hasta 4 agujas simultanéamente. Otra alternativa es conectar pipetas Pasteur descartables a un tubo de látex. El N_2 se puede utilizar también para almacenar un extracto de un día a otro utilizando un globo lleno de gas conectado a un balón de vidrio, de esta manera el gas satura el extracto impidiendo la entrada de oxígeno. También se lo utiliza para asegurar una atmósfera inerte durante el cerrado de ampollas.

Equipamiento

Para el desarrollo del curso será necesario disponer de un baño de arena, planchas de calentamiento y baños termostáticos con agua o secos. En el capítulo 5 se explican las precauciones a considerar con el baño de arena. Es sumamente importante destacar que en el trabajo con lípidos *no pueden utilizarse mecheros a gas* por el riesgo de incendio y explosiones que implica el uso de solventes en el laboratorio. También es necesario que las evaporaciones de solventes sean realizadas bajo campanas de extracción, como así también la pulverización de reactivos para tinción de placas de TLC, en este caso es necesario proteger al operador con gafas y mascarilla.



Fig. 1: manifold conectado a cilindro de N_2, pueden observarse 5 agujas para evaporación de solventes por arrastre conectados al manifold.

Disposición de solventes usados en el laboratorio

Los solventes usados en los procesos de extracción y cromatografías deben ser almacenados en frascos etiquetados y tratados de acuerdo a las normas vigentes en cada institución, no se deben verter en los desagües de los laboratorios por los peligros de contaminación, saturación de vapores y peligro de incendio.

Cerrado de ampollas de vidrio

Materiales: cilindro de N_2, aguja de acero inoxidable, vaso de Dewar, N_2 líquido, pinzas, guantes, mechero con llama oxídrica (en el comercio existen también mecheros especiales de doble boca para cerrar ampollas), en este caso puede utilizarse un soplete del tipo Rothenberger (Roxy-kit 120 L, Germany) que es más económico y fácil de encontrar en los comercios de insumos de refrigeración.

Procedimiento:

1. en una ampolla limpia de 0.5 mL se colocan 100 - 200 μL de extracto lipídico o estándar de lípidos e inmediatamente utilizando una pinza se sumerge en el vaso de Dewar que contiene el N_2 líquido durante 20 segundos, como se muestra en la figura 2.



Fig. 2: congelamiento del extracto lipídico en N_2 Líquido por inmersión en vaso de Dewar. Se recomienda extrema precaución en el manejo del N_2 líquido.

2. se extrae del Dewar y se le inserta la aguja de acero inoxidable por la que fluye suavemente el N_2, a continuación se coloca el cuello de la ampolla en la llama del mechero y se rota suavemente hasta que el vidrio se funde, ver figura 3.

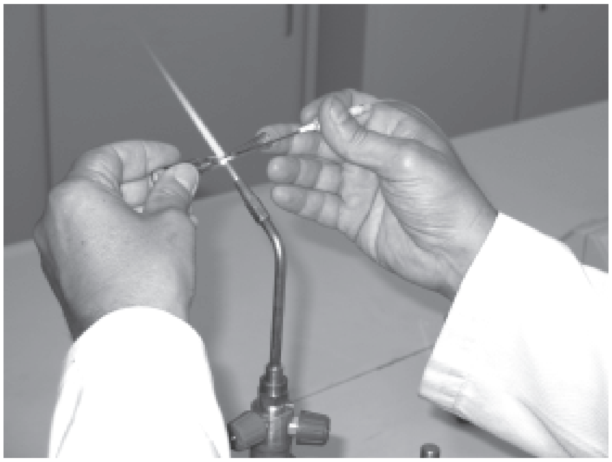


Fig. 3: calentamiento del cuello de la ampolla fluyendo el N_2 para desalojar el aire del interior de la ampolla. Apenas se enrojece el vidrio retirar rápidamente la aguja que aporta el N_2.

3. Inmediatamente se retira la aguja de N_2 mientras se estira el vidrio para cerrar la ampolla como se muestra en la figura 4.

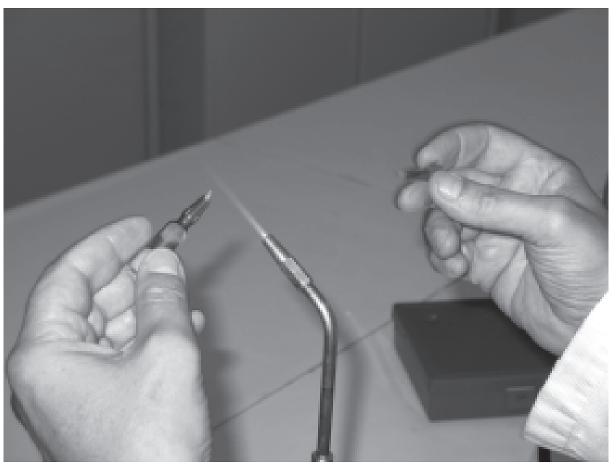


Fig. 4: cierre de la ampolla retirando la misma de la llama del mechero.

4. Una vez enfriadas las ampollas se las etiqueta y almacena a las temperaturas indicadas para la conservación del material.

NOTAS

Capítulo 3

Solventes orgánicos utilizados en el análisis de lípidos

Raquel M. Cravero

Consideraciones generales

Pureza en química, es un concepto ideal referido a la situación donde un producto consiste de un único tipo de moléculas. La pureza de un producto es una noción relativa y dependiente de los métodos analíticos y de su ejecución o desempeño. No hay un criterio experimental adecuado al de pureza ideal 100%, se puede lograr solo una aproximación experimental.

Un solvente es considerado suficientemente puro si no contiene impurezas en cantidad para interferir sobre la calidad admisible del producto en la manufactura de la cual participa. Aquí debemos pensar que se trata de no contener impurezas detectables analíticamente.

Para que los solventes sean usados como medio de reacción, éstos deben tener un rango aceptable en el punto de ebullición y buena estabilidad térmica y química. La pureza debe ser de grado elevado y depende de la etapa de reacción considerada: en una reacción en medio anhidro se necesita controlar el nivel de agua a nivel de ppm (partes por millón), mientras que los solventes empleados en reacciones comunes, extracción o cromatografía, deben ser absoluta y químicamente inertes.

Naturaleza y origen de las impurezas contenidas en los solventes

Se considera que un solvente usado a nivel industrial, raramente es puro. Los solventes industriales pueden contener impurezas que provienen de su proceso de obtención, impurezas originadas por su transporte en contenedores, estabilizadores, e impurezas resultantes de alguna transformación durante la reacción química. Estos subproductos podrían ser menos volátiles que el solvente principal y en consecuencia, concentrarse en el producto deseado, impurificándolo.

Los diferentes tipos de impurezas que provienen de los procesos de manufactura de los solventes más usados son:

Hidrocarburos	*Tipos de Impurezas*
Tolueno	metiltiofeno, benceno, hidrocarburos parafínicos
Xileno	mezcla de orto, meta y para isómeros, hidrocarburos parafínicos, etil benceno y compuestos de azufre
Ciclohexano	benceno, hidrocarburos parafínicos, compuestos carbonílicos
Compuestos halogenados	
Diclorometano	cloroformo, tetracloruro de carbono, clorometano
Cloroformo	cloro, fosgeno, diclorometano, tetracloruro de carbono, cloruro de hidrógeno
Tetracloruro de carbono	cloruros, cloro, disulfuro de carbono
Alcoholes	
Metanol	agua, acetona, formaldehído, etanol, formiato de metilo, éter dimetílico, dióxido de carbono, amoníaco
Etanol	aldehídos, cetonas, ésteres, água, éter etílico, benceno (si el etanol es anhidro)
2-Propanol	agua, peróxidos
Éteres alifáticos y cíclicos	
Éter etílico, Éter isopropílico, Éteres monoalquilados, Etilenglicol, Dietilenglicol, otros	alcoholes provenientes de su fabricación, agua, aldehídos, peróxidos
Tetrahidrofurano	agua, peróxidos
Dioxano	acetaldehído, agua, ácido acético, glicol acetal del paraldehído, crotonaldehído, peróxidos
Cetonas	
Acetona	metanol, ácido acético, agua
Ésteres	
Acetato de metilo	ácido acético, agua, metanol
Acetato de etilo	ácido acético, agua, etanol
Amidas	
Formamida	ácido fórmico, formiato de amonio, agua
N,N-Dimetilformamida	N-Metilformamida, ácido fórmico, agua

Nitrilos

Acetonitrilo	acetamida, acetato de amonio, amoníaco, agua, tolueno

Compuestos Nitro

Nitrobenceno	nitrotolueno, dinitrotiofeno, dinitrobenceno, anilina

Como se ha mencionado anteriormente, existen impurezas originadas por *la* contaminación proveniente de los contenedores no correctamente lavados y almacenados en cantidad industrial. Si se utilizaren estos solventes como tales, el operador debiera tener en cuenta que podrían ocurrir ciertos incidentes o comportamientos poco comunes.

En cuanto a los estabilizadores, por tratarse de un asunto de confidencialidad existe dificultad para conocer cuál es el usado; aunque algunos de ellos que son bien conocidos se pueden citar:

Estabilizadores usados en solventes

Diclorometano	etanol, 2-metil-2-buteno
Cloroformo	etanol, 2-metil-2-buteno
Éter dietílico	2,6-di-tert-butil-4 metilfenol (BHT)
Tetrahidrofurano	BHT, p-cresol, hidroquinona, hidruro de calcio

Toxicidad de los solventes orgánicos

En términos generales, los solventes orgánicos pueden actuar como tóxicos nerviosos generales: tales como los alcoholes primarios, los éteres, los aldehídos, las cetonas y algunos ésteres; como tóxicos irritantes de los pulmones como los ésteres metílicos y los ésteres fórmicos; como venenos de la sangre como el benceno y sus derivados los glicoles; tóxicos para el hígado y las actividades metabólicas, como los hidrocarburos halogenados; tóxicos para el riñón como tetracloroetano y los glicoles y específicos nerviosos como el sulfuro de carbono y el tricloroetileno. Los solventes de mayor toxicidad son: el benceno y sus homólogos, clorobenceno, hidrocarburos cíclicos y derivados halogenados, en general. Muy tóxicos son el metanol, cloruro de metilo, sulfato dimetílico, tetracloroetano, pentacloroetano y sulfuro de carbono.

El riesgo de intoxicación por solventes es frecuente en las industrias, fundamentalmente por el empleo constante y en cantidad de los mismos, pudiéndose saturar la atmósfera de sus gases, los que son inhalados por sus operadores con los consiguientes riesgos. Es por ello necesario se implementen normas estrictas de bioseguridad en fábricas y laboratorios en general.

Purificación de solventes orgánicos comunes

Cuanto más inerte y no reaccionante sea un solvente con las moléculas

disueltas en él, menos afectará el comportamiento del soluto en las diferentes reacciones. Es por ello que se apunta siempre a afirmar la idea de que es importante controlar la calidad de los solventes usados en las diferentes áreas de su actividad.

Los solventes utilizados para los procedimientos de extracción y cromatografía deben tener cierta inercia química con la muestra y el adsorbente, además de un elevado grado de pureza, hecho fundamental para la reproducibilidad de los tiempos de retención.

Los solventes orgánicos elegidos para extracciones de lípidos (más aún de pequeñas cantidades), deben ser de buena calidad y pueden adquirirse como productos puros comerciales y en caso de que sean requeridos grandes volúmenes en varios procedimientos a efectuar –debido al elevado costo– pueden purificarse los solventes técnicos comerciales.

En tal caso, es importante asegurarse que todo el material de vidrio utilizado para la destilación esté libre de grasa de cualquier tipo.

También se tendrá en cuenta que los vapores del solvente pueden contactarse con tapones de goma o plástico inadecuados donde ciertos contaminantes podrían ser extraídos por dicho solvente.

Los solventes empleados en extracciones o cromatografía de lípidos necesitan ser de-aireados por burbujeo de nitrógeno a través de los mismos, procedimiento que evita que aquellos lípidos con elevado grado de insaturaciones sean oxidados con el aire presente.

Acetona $(CH_3)_2C=O$ p.e. 56.2 ºC. La calidad del reactivo de grado analítico generalmente contiene menos del 1% de impurezas orgánicas aunque también puede contener un 1 % o más de agua. Puede purificarse por secado con Drierite ($CaSO_4$ anhidro) o K_2CO_3 anhidro (25 g/L), acompañando con agitación, luego se filtra separando el agente desecante y se destila utilizando un aparato de destilación provisto de una columna eficiente y un tubo desecante con Drierite.

Como método alternativo: se agregan pequeñas porciones de $KMnO_4$ a la acetona a reflujo, hasta persistencia del color violeta, luego se seca y destila.

Cloroformo (Cl_3CH) p.e. 61.2 ºC. La purificación simple del cloroformo comercial se lleva a cabo por 2-3 lavados con agua para remover el EtOH, se seca con K_2CO_3 o $CaCl_2$, se filtra, se calienta a reflujo con P_2O_5, o $CaCl_2$ y se destila. El destilado se guarda en frasco de color caramelo y en la oscuridad para evitar la formación fotoquímica de fosgeno. Como purificación alternativa, el cloroformo puede ser agitado en una ampolla de decantación con pequeñas porciones de H_2SO_4 concentrado, lavado con agua y secado con $CaCl_2$ o K_2CO_3 antes de filtrar y destilar. El EtOH también puede ser removido del cloroformo por pasaje a través de una columna de alúmina activada.

Eter dietílico ($(CH_3CH_2)_2O$, Et_2O) p.e. 34.6 °C. Las impurezas comerciales son agua, alcohol etílico y peróxido de etilo en casos donde hubo exposición a la luz y al aire por cierto tiempo.

La presencia de peróxidos se detecta de la siguiente manera: agite 2 mL de éter dietílico con 1 mL de una solución de ioduro de potasio al 10%. Si hubiere peróxido, éste reacciona con el ioduro para formar iodo, el cual puede

ser monitoreado por agregado de una gota de solución indicadora de almidón. La aparición de una coloración azul indica la presencia de iodo y por ende la presencia de peróxido.

Los peróxidos pueden eliminarse por agitación de una solución acuosa de sulfito de sodio. Otro método de remoción de peróxidos es por agitación del éter dietílico con una solución concentrada de una sal ferrosa: 5 g de sal ferrosa (10 mL de una solución concentrada de la misma) por 1L de Et_2O.

Preparación de una solución concentrada de sal ferrosa: Sulfato ferroso (60 g), ácido sulfúrico cc. (6 mL) y agua (110 mL).

El Et_2O (1 L) es agitado vigorosamente en una ampolla de decantación con la solución ferrosa (10 mL) diluida con agua (100 mL). Se desecha la capa acuosa y la fase orgánica se transfiere a un erlenmeyer protegido de la luz, donde se agregarán 150 g de cloruro de calcio anhidro. La mezcla se deja en contacto 24 h, con agitación esporádica. Agua y alcohol son removidos en esta etapa de secado. Filtrar la solución con embudo provisto de papel de filtro a un balón de destilación seco donde es agregado sodio metálico en pequeños trozos. Se tapa con un adaptador de vidrio provisto de un tubo con agente desecante para permitir el escape de hidrógeno. Cuando no se desprendan más burbujas de la solución y aún permanezcan los trozos de sodio de color metálico, se destila en un aparato de destilación adecuado con previo calentamiento a reflujo de la solución en atmósfera de nitrógeno, recogiendo el destilado de punto de ebullición constante en recipiente seco. Es conveniente conservar el producto por períodos cortos de tiempo, es por ello que se recomienda efectuar el procedimiento antes del experimento a realizar.

Etanol (CH_3CH_2OH, EtOH) p.e. 78.3 ºC. Etanol absoluto (99.5% etanol), Etanol rectificado (95.6% etanol). El etanol rectificado es convertido a absoluto por calentamiento a reflujo con CaO por 6 h, dejar 12-24 hs a temperatura ambiente y luego destilar con precaución de excluir la humedad.

Etanol súper seco (99.8 % de pureza): pueden usarse varios métodos partiendo de alcohol absoluto y teniendo en cuenta las siguientes reacciones:

$$Mg + 2\ C_2H_5OH \longrightarrow H_2 + Mg(OC_2H_5)_2$$

$$Mg(OC_2H_5)_2 + 2\ H_2O \longrightarrow Mg(OH)_2 + 2\ C_2H_5OH$$

En un aparato de destilación provisto de un tubo con agente desecante (cloruro de calcio), se colocan 5 g de granallas de Mg limpias y secas, 0,5 g de iodo y 60 ml de etanol absoluto. La mezcla se calienta suavemente hasta desaparición del iodo: si continúa la evolución de hidrógeno, puede agregarse un adicional de 0,5 g de iodo. Se continúa el calentamiento hasta que todo el magnesio es convertido a etóxido de magnesio.

Se agrega 1L de etanol y se mantiene la mezcla con calentamiento a reflujo por 2 h, destilando luego el etanol y recogiendo el destilado en recipiente limpio y seco. Tapar y usar protegiéndolo de la humedad atmosférica.

Puede conservarse por agregado al recipiente que lo contiene de agentes desecantes como tamices moleculares de tipo 4A.

n-Hexano (C_6H_{14}) p.e. 68.7 ºC y **n-Heptano** p.e. 98 ºC. Las fracciones del éter de petróleo (libres de hidrocarburos aromáticos) son las llamadas n-hexano y n-heptano. La purificación puede efectuarse directamente por secado con cloruro de calcio anhidro, en una etapa previa a la destilación. Si aún se necesitare el solvente perfectamente seco, debiera destilarse *a posteriori* de haber permanecido en previo contacto con sodio.

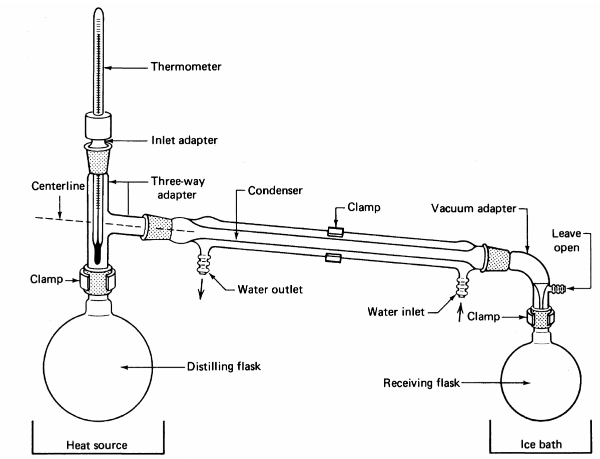
Isopropanol ($(CH_3)_2CHOH$, *i*-PrOH) p.e. 82.5 ºC. La purificación del alcohol isopropílico sigue el mismo procedimiento que la del alcohol n-propílico. El alcohol se calienta a reflujo con CaO por varias horas y luego se efectúa una destilación con columna de rectificación. Se requieren otros métodos más laboriosos para la remoción de impurezas como NH_3 y demás, cuando se parte de una calidad del alcohol poco conocida.

Metanol (CH_3OH) p.e. 64.5 ºC. El metanol anhidro se prepara a partir del metanol absoluto comercial por secado con CaH_2, $CaSO_4$ o con sodio, que reaccionan con el agua presente y luego, es destilado.

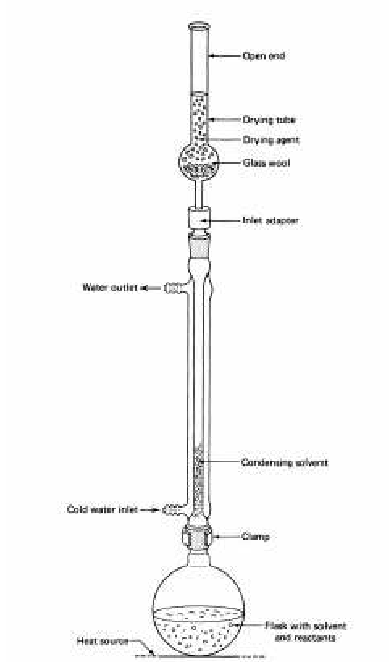
Otro método frecuentemente utilizado en la preparación de metanol absoluto y genuino emplea el metanol absoluto comercial que se trata con magnesio activado por iodo, formándose así metóxido de magnesio (como se describe para etanol): se colocan granallas de magnesio (5 g), iodo (0,5 g) y 50-75 mL de metanol absoluto en un balón de destilación provisto de un adaptador de vidrio con tubo con agente desecante (cloruro de calcio) incorporado. La mezcla se calienta suavemente hasta desaparición del iodo. Si continúa la evolución de hidrógeno, puede adicionarse 0,5 g de iodo. El calentamiento se continúa hasta que todo el magnesio se convierta en metóxido de magnesio. Se agrega 1L de metanol manteniendo la mezcla a reflujo por 1-2 h. Se procede a la destilación del metanol descartando los primeros mL y recogiendo el destilado en un recipiente limpio y seco. Tapar y usar protegiéndolo de la humedad atmosférica.

Tetracloruro de carbono (Cl_4C) p.e. 76.8°C. El tetracloruro de carbono no debe secarse con sodio porque puede surgir una explosión. El grado analítico es suficientemente puro para la mayoría de los propósitos. El producto técnico puede contener disulfuro de carbono que se remueve por tratamiento de 1 L de tetracloruro de carbono comercial con KOH disuelto en igual peso de agua y 100 mL de alcohol rectificado. Agitar la mezcla a 50 °C por 30 minutos. Lavar con agua y repetir el proceso con la mitad de la cantidad de KOH. El alcohol se elimina por agitación con agua, 2-3 veces, seguido de agitación con porciones de H_2SO_4 concentrado hasta no más coloración, lavar con agua, secar con $CaCl_2$ o $MgSO_4$ y destilar.

Esquema simple de los aparatos utilizados para purificación de solventes



Destilación simple



Destilación fraccionada

Referencias bibliográficas

1. WYPYCH, G. *Handbook of Solvents*. ChemTec Publishing, Toronto-New York 2001, ISBN 1-895198-24-0.
2. VOGEL, A. I. *Practical Organic Chemistry*. Arthur I. Longman Group Limited, London 1974, ISBN 0-582-44245-1.
3. ARMAREGO, W. L. F. and PERRIN, D. D. *Purification of Laboratory Chemicals*. Butterworth-Heinemann, Linacre House, Jordan Hill, Oxford 2000, ISBN 0-7506-3761-7.
4. GORDON, A. J. FORD, R. A. *The Chemist´s Companion. A Handbook of Practical Data, Techniques, and References.* John Wiley & Sons 1972, ISBN 0-471-31590-7.
5. FLICK, E. W. *Industrial Solvents Handbook*. Noyes Data Corporation. New Jersey 1998, ISBN 0-8155-1413-1.
6. ZUBRICK, W. *The Organic Chem Lab Survival Manual*. John Wiley & Sons, Inc. United States of America 1988, ISBN 0-471-85519-7.

NOTAS

Capítulo 4

Esquema general del análisis de lípidos de biomembranas - Extracción de lípidos

Joaquín V. Rodríguez y María E. Mamprin

Esquema general del análisis de lípidos de biomembranas

Obtención del material de partida purificado: es obvio aclarar que la preparación de membranas no debe estar contaminada con otros tipos de membranas de organelas, etc. Existe una amplia literatura específica dedicada al tema. Estos procedimientos exceden el alcance de este curso y por ende dependerán del analista. Es importante considerar dos aspectos de la preparación que pueden incidir en el posterior análisis de lípidos: 1- el procedimiento de preparación de membranas puede causar pérdida o degradación de los mismos debido al tiempo y a las técnica usada para obtenerlas[1], 2- ciertas sustancias utilizadas para la obtención y preparación pueden afectar el análisis de lípidos[2]. El material de partida elegido para la aplicación del análisis de biomembranas será la membrana del eritrocito de origen humano o de rata, esta elección se basa en que este material es fácil de obtener, conservar y purificar en cantidades, es un material económico para la puesta a punto de técnicas y además la composición de la membrana del eritrocito está suficientemente estudiada como para obtener datos comparativos y verificar nuestra metodología.

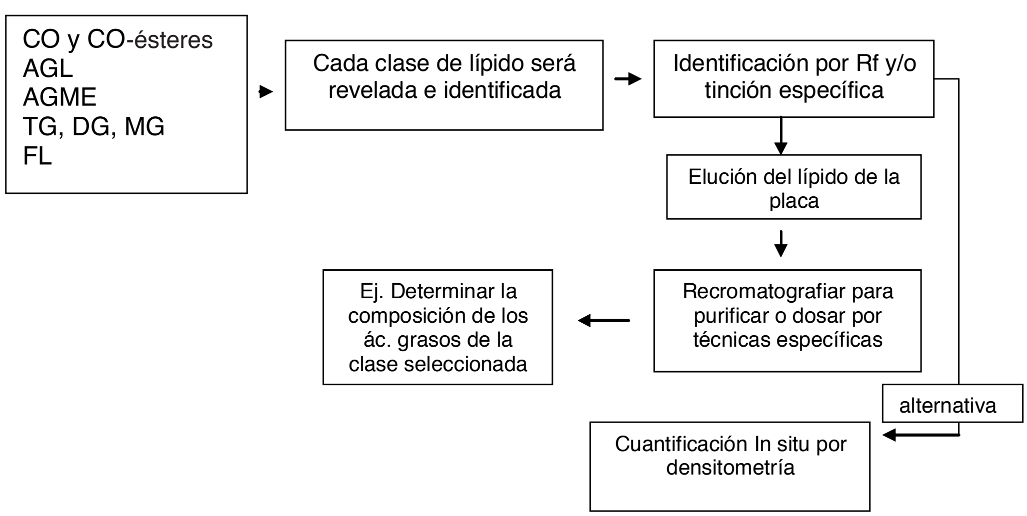
Extracción de lípidos de membranas: la primera etapa en el análisis de lípidos consiste en extraer los lípidos del medio biológico en el que están, esta extracción debe ser cuantitativa, reteniendo su integridad estructural y sin contaminaciones con sustancias no-lipídicas como proteínas, azúcares y otros constituyentes de la membrana. El éxito del procedimiento dependerá del tipo de lípido involucrado, el estado físico del lípido en la estructura celular y de la capacidad del analista para controlar reacciones indeseables tales como la oxidación y la hidrólisis de lípidos esterificados durante el procedimiento de extracción. Se han desarrollado distintos métodos: la extracción líquido-líquido (ELL) y la extracción de fase sólida (EFS). En este curso por razones de costo y tamaño de la muestra utilizaremos la ELL. Dentro de los distintos métodos

existentes en la ELL, la elección del método a aplicar dependerá si el material de partida (membranas) fueron obtenidos como un pellet, una suspensión concentrada o diluida.

Separación de clases de lípidos: una vez extraídos los lípidos de las biomembranas se deben realizar análisis para separar las distintas clases, identificarlos y cuantificarlos. Para ello se han desarrollado numerosas técnicas cromatografícas en las que el principio de separación es el mismo: todos los sistemas cromatográficos consisten de una fase móvil y una fase estacionaria, la muestra se siembra en la fase estacionaria (que puede ser un sólido o un líquido) y la fase móvil (que puede ser un líquido o un gas) pasa a través del sistema separando los componentes de la mezcla en base a las distintas afinidades que las propiedades fisicoquímicas de los componentes imponen a las dos fases. Los métodos más usados son: la cromatografía en capa fina (TLC), la cromatografía de gases (GLC) usualmente utilizada para separar e identificar AG presentes en las distintas clases de lípidos, la cromatografía de alta performance (HPLC) y la LC-MS (cromatografía líquida-espectrometría de masa)(3) que permite la identificación y cuantificación directa de lípidos. Debido a los requerimientos de equipamiento específico para el desarrollo de técnicas de HPLC y LC-MS y sus altos costos de adquisición y funcionamiento esta técnicas no están fácilmente disponibles en la mayoría de los laboratorios. En este curso utilizaremos mayormente la TLC y la GC para el análisis de lípidos de membranas. La TLC nos permitirá en una segunda etapa del análisis separar las distintas clases de lípidos componentes de las biomembranas:

Separación de LNP o lípidos simples y LP o lípidos complejos

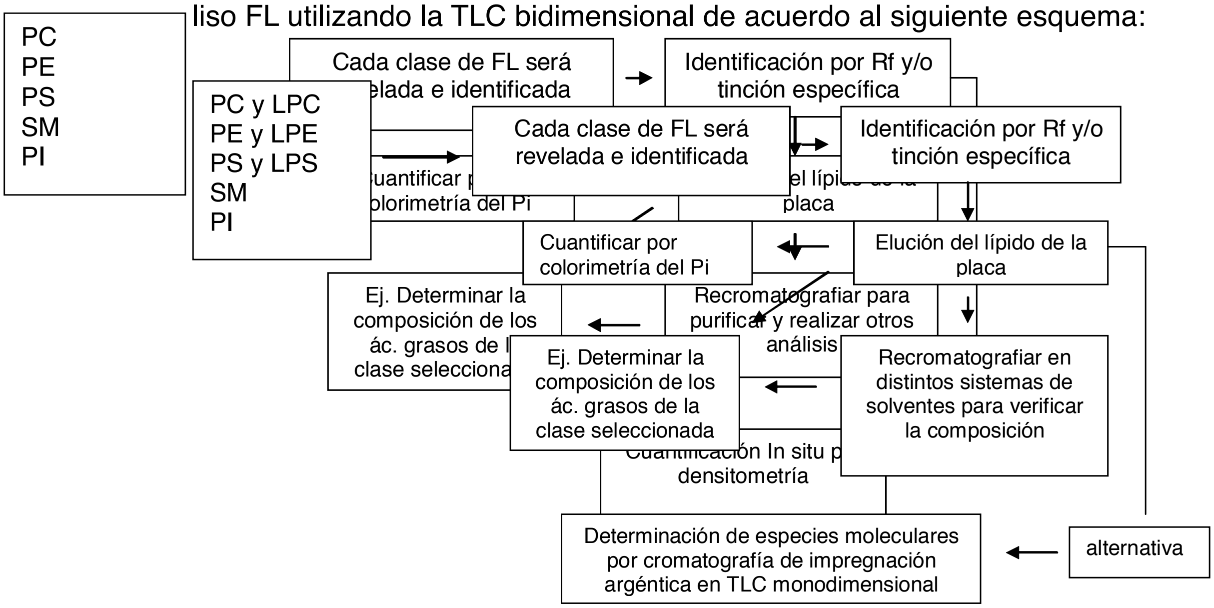
Mediante TLC monodimensional separaremos las mayores clases de lípidos para luego identificarlos, eluirlos de la placa y cuantificarlos de acuerdo a técnicas específicas o cuantificarlos in situ por densitometría. El procedimiento se hace según el esquema siguiente:



Separación de fosfolípidos

En la tercera etapa realizaremos la separación de los principales FL de membrana utilizando la TLC monodimensional en dos etapas de acuerdo al siguiente esquema:

En la cuarta etapa realizaremos la separación e identificación de los FL y liso FL utilizando la TLC bidimensional de acuerdo al siguiente esquema:



En la quinta etapa realizaremos el análisis de la composición de ácidos grasos del extracto lipídico por GC con el fin de obtener el perfil general de los

mismos en la muestra. Veamos ahora una explicación más detallada de cada etapa del análisis.

Extracción de lípidos

Los lípidos se encuentran en los tejidos en varias formas físicas: los lípidos simples a menudo se disponen en grandes agregados en tejidos de almacenamiento y son fácilmente extraíbles, los lípidos complejos son generalmente constituyentes de membranas y están asociados a proteínas y polisacáridos con los que interactúan y no son fácilmente extraíbles.

Definición del procedimiento: Idealmente el procedimiento de extracción de lípidos debe conducir a la extracción cuantitativa de los lípidos celulares, en un estado no degradado ni contaminado con compuestos no lipídicos constituyentes de los tejidos como aminoácidos, azúcares, nucleótidos, etc.

La efectividad del procedimiento depende de la naturaleza química de los compuestos lipídicos y del tipo de asociación que éstos tienen en la célula. La extracción es entonces un compromiso entre romper los enlaces lípido-componentes celulares y no romper los lípidos mismos.

Hay tres tipos de asociaciones en los que participan los lípidos:

a. ***Asociaciones hidrofóbicas o de Van der Waals:*** en las que los lípidos neutros o no polares (ésteres de esteroles, glicéridos, etc.) están unidos por fuerzas no-covalentes débiles a través de sus cadenas hidrocarbonadas a otros lípidos o a regiones hidrofóbicas de proteínas, Ejemplo grasa del tejido adiposo, ac. grasos a Albúmina plasmática, quilomicrones, etc.

Los lípidos asociados hidrofóbicamente (2 Kcal/mol) pueden ser extraídos con solventes no polares como hexano, ciclohexano, tolueno y algunos algo más polares como éter etílico, Cl_3CH o benceno. Estos lípidos tienden a ser insolubles en solventes polares como alcoholes y especialmente MetOH.

b. ***Enlaces de hidrógeno y asociaciones electrostáticas e hidrofóbicas:*** en las que los lípidos polares están unidos a proteínas por enlaces de hidrógeno o fuerzas electrostáticas y/o hidrofóbicas, como en la plasma membrana, mitocondria, retículo endoplásmico y lipoproteínas séricas.

Los lípidos asociados a membranas requieren solventes polares tales como MetOH, EtOH y Cl_3CH para romper los enlaces hidrógeno o las fuerzas electrostáticas entre lípidos y proteínas (0.5-12 Kcal/mol).

c. ***Asociaciones covalentes:*** en las que los ácidos grasos, hidroxiácidos o ácidos grasos ramificados están unidos en forma covalente como ésteres, amidas o glico a estructuras polisacáridas; ejemplo lipopolisacáridos en la pared celular de bacterias.

Los lípidos que tienen uniones covalentes no pueden ser extraídos directamente, primero se deben romper esos enlaces por hidrólisis ácida o alcalina.

Características de los solventes utilizados para la extracción de lípidos

1. Volatilidad (facilita la posterior remoción para obtener un pequeño volumen del extracto).
2. No debe tener impurezas reactivas (para obviar posibles reacciones con los lípidos del extracto).
3. Capacidad para formar dos fases con el agua (p/remover las sustancias no lipídicas provenientes del proceso de extracción).
4. Capacidad para no extraer componentes no deseados (proteolípidos, moléculas pequeñas, etc.).
5. Transparencia al UV (para el caso de realización de análisis posteriores, ejemplo HPLC).
6. Baja toxicidad.
7. Bajo costo.

Tratamiento de membranas para la extracción de lípidos

Antes de realizar cualquier análisis es necesario extraer cuantitativamente los lípidos libres de contaminantes no lipídicos y ello debe realizarse en las siguientes condiciones:

a. Debe realizarse lo más rápido posible
b. Debe minimizarse o evitarse la autooxidación
c. No se debe introducir contaminantes o generar cambios (artefactos) en la composición de los lípidos del extracto.

Consideraciones prácticas

Rapidez: se impide la degradación y ruptura de lípidos por enzimas proteolíticas y lipolíticas (fosfolipasas), si no se puede proceder rápidamente se debe trabajar en Cl_3CH a -20 °C (en vidrio). Esto no es siempre efectivo especialmente cuando se extraen lípidos de bacterias.

Minimizar la autooxidación: las reacciones de autooxidación son catalizadas por trazas de iones y por la luz. Por ello es importante prevenir el contacto con el aire, por ejemplo prevenir la formación de espuma durante la concentración de los extractos, para ello agregar pequeñas cantidades de Benceno-EtOH. Se deben utilizar antioxidantes en los solventes, *Butil hidroxil tolueno (BHT) 0.05 %*, recordar que es volátil y puede ser arrastrado por el N_2 durante las evaporaciones. No agregar grandes cantidades porque puede ser prooxidante en esas condiciones.

Evitar contaminantes y artefactos:

- contaminación de solventes, es el caso de sustancias usadas como estabilizadores que pueden reaccionar con los lípidos (ver cap. 3)
- crecimiento bacteriano en las soluciones o extractos
- no utilizar plásticos ya que liberan los catalizadores (diésteres del áci-

do ftálico) y ellos cocromatografían con los lípidos, además dan alta absorción al UV

- obviar el contacto con los marcadores al solvente, cosméticos para manos, lubricantes, grasas para vacío
- prevenir la hidrólisis enzimática (inactivar enzimas por ebullición, o usar alcoholes, ejemplo la fosfolipasa D es activa en ButOH/agua pero el isopropanol la inactiva).

Remoción de solventes de extractos lipídicos

Los pequeños volúmenes se pueden remover por evaporación bajo corriente de N_2 en campana de extracción. Para acelerar el proceso puede aumentarse la temperatura del extracto usando un baño termostático y generando la corriente del N_2 sobre la superficie del extracto por medio de agujas de acero inoxidable.

Los extractos no deben ser calentados a más de 40-50 °C.

Los volúmenes grandes de solvente pueden ser concentrados utilizando un evaporador rotatorio.

Almacenamiento y conservación de extractos lipídicos

No conservar los extractos en seco ya que aumenta la superficie de exposición al aire y a la oxidación, también el BHT puede arrastrarse al secar el extracto. Deben almacenarse en recipientes de vidrio (ampollas o viales, en solventes no polares a -20 °C o menos, debe excluirse el aire con N_2 y si se almacena por largo tiempo, hacerlo al vacío.

Para almacenar grandes cantidades por corto tiempo (24-48 horas), puede utilizarse balones de vidrio con septos y un globo inflado con N_2 para mantener una atmósfera inerte.

Mezclas para almacenar lípidos: Benceno: EtOH absoluto (4:1) v/v -25 °C, Benceno: MetOH (4:1) v/v -25 °C, Tolueno: MetOH (4:1) v/v -25 °C. A estas mezclas se le puede agregar BHT 0.03%.

Métodos de extracción

Método de Folch[4]: este procedimiento puede ser aplicado a pequeñas cantidades de tejidos o preparaciones de membranas (pellets).

Reactivos: MetOH, Cl_3CH

Fase superior: Cl_3CH: MetOH:H_2O (3:48:47) v/v/v

Fase superior c/ KCl 0.37 %

Mix: Cl_3CH:MetOH (2:1) v/v

Materiales: Tubos de extracción con tapa esmerilada, embudo de Buchner, filtros de fibra de vidrio o lana de vidrio lavada y secada en estufa.

Técnica:

1. Se homogeiniza el tejido con Cl_3CH: MetOH (2:1) a una relación de 20 partes de la mezcla por parte de tejido. Se asume que 1 gr de tejido = 1 mL. Puede utilizarse un homogeinizador de vidrio tipo Potter-Helvegem, homogeneizar en frío (recipiente con hielo en escamas).
   Para cantidades de tejido mayores a 1 gr, pueden utilizarse licuadoras tipo Omnimixer o Ultraturrax, se debe usar 17 volúmenes de solvente por volumen de tejido, hacerlo en etapas y luego reunir todos los homogeneizados y llevar a 20:1 en probeta o frasco volumétrico (siempre mantener los homogeneizados en frío).
2. Filtrar el extracto a través de lana de vidrio o filtros de fibra de vidrio, colocados en un embudo de Buchner. Puede también centrifugarse el extracto. *Recordar que 1 mL de extracto equivale a 0.05 g de tejido.*
3. Lavado del extracto: el extracto crudo se mezcla con 0.2 volúmenes (respecto del volumen total) de fase superior que contiene KCL 0.37 %. Se agita vigorosamente durante 3 minutos, luego se deja decantar o se centrifuga. En el tubo pueden observarse 2 fases, una superior (40 % del volumen total) que contiene los contaminantes no lipídicos (Glucosa, urea, aminoácidos, gangliósidos, etc.) y la fase inferior (60 % del volumen total) que contiene los lípidos. La fase superior se sifona con pipeta pasteur y se tira, la fase inferior se lava tres veces con fase superior pura utilizando pequeños volúmenes y haciéndolos correr por las paredes del tubo con el fin de arrastrar las impurezas que restan. Luego se centrifuga (2000 g) y se descartan los restos de la fase superior. Si queda algún remanente se agregan unas gotas de MetOH para hacer una sola fase y se lleva a volumen con Cl_3CH:MetOH (2:1) o se concentra para almacenar.
   Para recuperar gangliósidos de la fase superior, se debe evaporar el exceso de solventes orgánicos y dializar vs. agua, luego liofilizar.

Método de Bligh y Dyer[6]: este procedimiento es apropiado cuando la muestra a analizar presenta grandes cantidades de agua (cultivo bacteriano, etc.) y no es posible concentrar el material a extraer. La recuperación no es tan buena como en el procedimiento de Folch.

Técnica:

1. Homogeinización de la muestra: 1 gr de muestra (conteniendo aproximadamente 80 % de agua) es homogeneizado con 3 mL de Cl_3CH:MetOH (1:2) v/v. Si el sistema obtenido no es bifásico se debe agregar más mezcla de Cl_3CH:MetOH.
2. El homogenado se filtra a través de lana de vidrio o filtros de fibra de vidrio y el residuo se reextrae con 1 mL de Cl_3CH.
3. Los filtrados se combinan y se les agregan 1 mL de 0.1 M KCl, se agita vigorosamente y se centrifuga (2000 g). La fase superior y el material interfacial se aspiran y desechan, la fase inferior que contiene los lípidos se concentra.

Procedimientos específicos de extracción

Fosfoinosítidos: los fosfoinosítidos, los ácidos grasos libres y ciertos fosfátidos no son completamente extraídos por Cl_3CH: MetOH, por ello es necesario agregar 0.25 % HCl concentrado a la mezcla de solventes[6]. Este procedimiento puede hidrolizar los plasmalógenos.

Gangliósidos: los gangliósidos son parcialmente extraídos con Cl_3CH:MetOH (2:1), se debe hacer una extracción adicional con Cl_3CH:MetOH (1:2) que contenga 1/20 volúmenes de agua. Los extractos se unen y se ajustan a una relación Cl_3CH:MetOH (2:1), se debe hacer una extracción adicional con Cl_3CH: MetOH (2:1), luego se lavan con KCl y se recuperan en la fase superior[7].

Lisofosfolípidos: se pierden considerablemente con el método de Bligh y Dyer, ver la técnica descripta en Bjerve et al.[8].

Otros[9].

Referencias Bibliográficas

1. KAWAI, K., FUJITA, M. et al. Lipid components of two different regions of an intestinal epithelial cell membrane of mouse. *Biochem. Biophys. Acta* 1974; 369:222-233.
2. WEINSTEIN, D.B., MARSH, J.B. et al. Membranes of animal cells. IV. Lipids of the L cell and its surface membrane. *J. Biol. Chem.* 1969; 244:4103-4111.
3. PETERSON, B.L., CUMMINGS, B.S. A review of chromatographic methods for the assessment of phospholipids in biological samples. *Biomed. Chromat*. 2006; 20:227-243.
4. FOLCH, J. et al. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J.Biol. Chem*. 1957; 226:497-509.
5. BLIGH, E.G. et al. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol*. 1959; 37:911-917.
6. WELLS, M.A. et al. The quantitative extraction and analysis of brain polyphosphoinositides. *Biochemistry* 1965; 4:2459-2468.
7. SUZUKI, K. The pattern of mammalian brain gangliosides II. *J. Neurochem*. 1965; 12:629-638.
8. BJERVE, K.S., et al. The selective loss of lysophospholipids in some commonly used lipid-extraction procedures. *Anal. Biochem*. 1974; 58:238-245.
9. SAINT JOHN L.C. et al. Cell membrane techniques p I. *Biotechniques* 1989; 7:476-481.

Experimento 1: Obtención y purificación de un extracto de lípidos de membranas de eritrocitos de rata/humano, almacenamiento y conservación

Para la obtención de un extracto de lípidos provenientes de eritrocitos de rata/humano, utilizaremos la técnica de Rose y Ocklander[1]. Para ello se desarrollará el siguiente protocolo esquematizado en la Fig.1. La técnica consiste en obtener sangre anticoagulada con EDTA-Na_2 5 %, la que es centrifugada con el fin de separar el plasma de los eritrocitos y granulocitos. Luego del paquete celular se aspira cuidadosamente la capa blanquecina superior (granulocitos) y el mismo se lava con solución fisiológica fría (x 3) para finalmente resuspender los eritrocitos en el mismo volumen de solución fisiológica. En este punto es necesario determinar algún parámetro celular al que posteriormente se referirán los lípidos extraídos, puede utilizarse el valor de hemoglobina, o las proteínas totales, el hematocrito o el número de eritrocitos/mm^3 y sobre todo debe registrarse el volumen total de la suspensión celular. El paso siguiente es centrifugar el preparado con el fin de eliminar la solución fisiológica y agregar un volumen de agua destilada con el fin de hemolizar el paquete globular. El primer paso de extracción consiste en agregar isopropanol gota a gota agitando vigorosamente en vortex el tubo de extracción durante 15 min. Posteriormente se agrega el Cl_3CH de la misma manera agitando vigorosamente durante 15 min. Se obtiene un extracto y un precipitado gomoso oscuro de hemoglobina y proteínas que se adhiere a las paredes del tubo. Será entonces necesario centrifugar y filtrar a través de filtro de fibra de vidrio. Se descartará el precipitado y se inicia la purificación del filtrado adicionando al mismo KCl 0.37%, se homogeiniza se transvasa a otro tubo y se centrifuga eliminando la fase superior. La fase inferior se enfría a -20 °C durante unos minutos con el fin de separar las pequeñas gotas remanentes de fase superior que puedan haber quedado adheridas a las paredes del tubo, el remanente de esta fase se observa como un gota de diferente refracción en la interfase con la fase inferior. La que se aspira cuidadosamente con aguja de acero inoxidable o pipeta pasteur. Es importante no aspirar la fase inferior porque estaríamos retirando lípidos del extracto. La fase inferior se lleva a un volumen exacto con la mezcla isopropanol/Cl_3CH (11:7), el que es registrado. Del volumen obtenido se retiran 3 o 4 alícuotas de 0.5 mL para la posterior determinación de CO y 4 alícuotas de 50-100 ul para la determinación del fósforo proveniente de FL (P_i), volúmenes que son registrados. El extracto remanente se concentrará bajo corriente de N_2 a 37 ºC hasta obtener un extracto transparente de carácter oleoso. En el caso de que se obtenga un extracto turbio y/o espuma (lípidos emulsionados con agua), será necesario agregar pequeñas porciones de benceno o de las mezclas para almacenar lípidos y evaporar bajo N_2 hasta eliminar totalmente el agua remanente y obtener el extracto transparente que será redisuelto en un volumen determinado de mezcla para almacenar lípidos conteniendo BHT 0.03% este volumen será fraccionado en alícuotas (100 μL) y será conservado en ampollas cerradas bajo atmósfera de N_2 en frío.

Nota: el uso de sonicación a 0 °C durante el agregado del isopropanol y HCl_3C disminuye el tiempo de extracción y homogeinización 50% y aumenta la extracción de FL en aproximadamente 10%[2].

Drogas	**Materiales**
$EDTANa_2$ 5% Sol. Fisiológica - NaCl 0.9% Rvo Hemoglobina Agua destilada isopropanol Cl_3CH KCL 0.37 % Benceno:ETOH abs. (4:1), BHT 0.05%	Tubos de centrífuga y de extracción con tapa Tubos de vidrio para det. Co y P Jeringas y agujas descartables Tubos de hematocrito Cinta de teflón Baño de 37 °C Embudo de Buchner Filtros de fibra de vidrio y/o lana de vidrio Ampollas de vidrio neutro Pipetas Pasteur de vidrio Micropipeta regulable (hasta 20 μL) Pipetas de vidrio de 5 mL Centrífuga para hematocrito

Reactivo de Hemoglobina (determinación de Oxihemoglobina)

NH_4OH 0.1% - Se diluyen 4 mL de NH_4OH (δ = 0.88) en 1 L de agua destilada. Reactivo estable en frasco oscuro a temperatura ambiente.

Reacción

20 μL de sangre + 5 mL sol. NH_4OH 0.1%.

Mezclar y leer a 578 nm vs. blanco de Reactivo. El color es estable varias horas.

Cálculos

Vol. Muestra: 20 μL, Vol. Ensayo: 5.02 mL, ε Hb (578 nm) = 15400, PM Hb = 16114, b = 1 cm

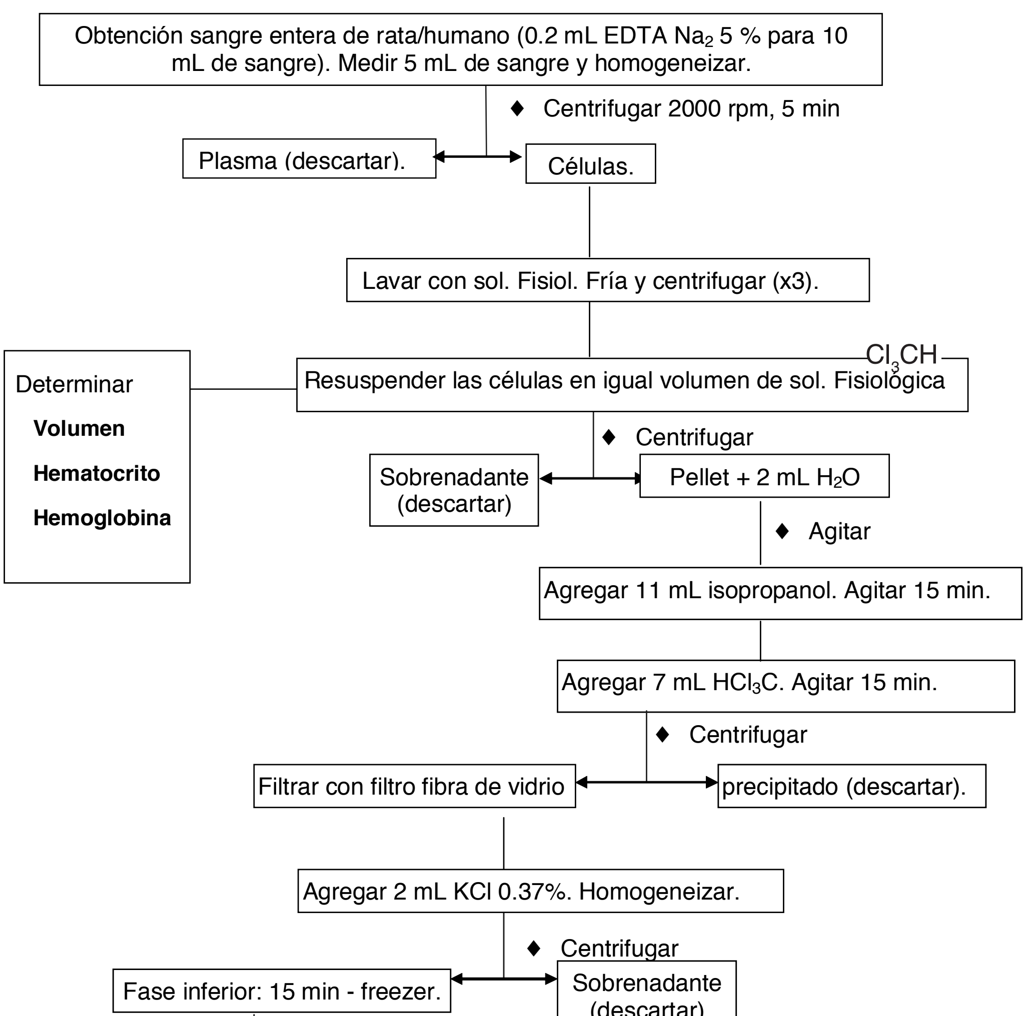
$$\text{Gr Hb/100 mL} = \frac{\text{Abs} \times 16114 \times 10^{-1} \times 5.02}{15400 \times 1 \times 0.02} = \text{Abs} \times 26.26$$

Fig. 1: protocolo de extracción de lípidos

5%

g, 5 min

Cl_3CH.



Notas adicionales

Almacenamiento de Eritrocitos para el dosaje de Lípidos

En el caso de que la extracción no pueda realizarse en momento de obtención de la muestra, los eritrocitos pueden almacenarse a - 20 °C utilizando la técnica descripta por Broekhuyse[3].

Los eritrocitos provenientes de 10 mL de sangre se purifican por el método previamente descripto. El paquete de células lavado se mezcla con igual volumen de NaCl 0.153 M y se mide el valor del hematocrito (usado como referencia). Luego se pipetean alícuotas de 2 mL de suspensión celular en tubos plásticos con tapa a rosca y se le agregan 0.2 mL de 9.57 % $Na_2S_2O_4$ (concentración final 0.05 M). En esta condición las células pueden almacenarse varios meses.

Porqué determinamos el Pi del extracto lipídico

La determinación del Pi nos dará una estimación del contenido de FL del extracto obtenido, el valor de Pi se convierte en el valor de FL al multiplicarlo por un factor que es el promedio del contenido de Pi de los principales FL. Si multiplicamos el valor de Pi proveniente del extracto lipídico por 25 (el contenido promedio de Pi en FL es del 4%) obtendremos una estimación adecuada del contenido de FL del extracto[4] (ver Tabla 2 en Capítulo 7).

Ejemplo: La fosfatidilcolina (PC) de huevo, tiene un PM: 787 (basado en la forma dioleil) y un porcentaje en peso de Pi de 3.93 % (Supelco).

Referencias Bibliográficas

1. ROSE, H.G., Oklander, M. Improved procedure for the extraction of lipids from human erythrocytes. *J. Lipid. Res.* 1965; 6:428-431.
2. BROEKHUYSE, R.M. Improved lipid extraction of erythrocytes *Clin. Chim. Acta* 1974; 51: 341-343.
3. BROEKHUYSE, R.M. Lomg term storage of erythrocytes for quantitative analysis of lipids *Clin. Chim. Acta* 1974; 52: 53-58.
4. LEES, M.B. Preparation and analysis of phosphatides. In Methods in Enzymology, Collowick, S.P. and Kaplan, N.O. Ed. 1957; III:328-345.

NOTAS

Capítulo 5

Determinación de fósforo de fosfolípidos a partir de extractos lipídicos

Giovanni Poletti y Carla Gallo

Introducción:

El fósforo se encuentra en una relación molar de 1:1 en los lípidos de membrana, en forma de grupos fosfato (ver capítulo 4). Por ello, es posible cuantificar las moles de fosfolípido en un extracto de membranas mediante la determinación del fósforo inorgánico presente en la muestra. Para obtener fósforo inorgánico a partir de una muestra de fosfolípidos es necesario liberar el fósforo mediante un proceso de hidrólisis ácida, el cual se conoce como mineralización. La determinación de fósforo inorgánico tiene la ventaja de ser un método colorimétrico, sensible y de bajo costo.

Fundamentos

Este método tiene dos etapas. La primera consiste en mineralizar al fósforo orgánico contenido en la cabeza polar de los fosfolípidos mediante una hidrólisis ácida, de acuerdo al método descrito por Hess y Derr [1]. En la segunda etapa, el fósforo inorgánico se hace reaccionar con molibdato de amonio en medio ácido, formando un complejo fosfomolibdato reducido que puede ser cuantificado colorimétricamente a 820 nm (reacción de Chen y col.[2], según lo descrito por Ames[3].

Se utiliza esfingomielina como control del proceso de mineralización debido a que es el fosfolípido más difícil de hidrolizar.

Reactivos

1. Reactivo A: Ácido Ascórbico 10 %. Preparar inmediatamente antes de usar.
2. Reactivo B: Molibdato de amonio (4 H_2O) 0.42% en 1 N H_2SO_4. Preparación: 1.05 g de molibdato + 7.15 mL de H_2SO_4 csp 250 mL.
3. Reactivo de Trabajo: 1 parte del reactivo A + 6 partes del reactivo B. Conservar en frío.

4. Solución estándar: KH_2PO_4 (PM 136.09) 10 mM. Secar en estufa (110 ºC 4 hs). Preparación de la solución estándar: 136.09 mg de KH_2PO_4 csp 100 mL. Diluir antes de usar (1mM = 1nmol/μL).
5. Estándard esfingomielina (PM 749): 10 mg de esfingomielina y llevar a 10 mL con la mezcla Cl_3CH:Metanol (5:1 v/v). Hacer diluciones de modo que 20 μL contengan 20 nmol de P.
6. Reactivo C: $HClO_4$ 60% (99 mL de $HClO_4$ 71 % densidad: 1.70 csp 200 mL con agua).
7. Reactivo D: H_2SO_4 10 N (56 mL de H_2SO_4 96 %, densidad: 1.835 csp 200 mL con agua).
8. Reactivo de mineralización: 6 partes del reactivo C + 2 partes del reactivo D.

Equipos y material de laboratorio:

- Estufa de hasta 160 ºC.
- Baño de arena a 190 ºC (o plancha portátil de inducción con olla de arena)[1].
- Baño de agua a 37 ºC.
- Pipetas de desplazamiento positivo o microjeringas Hamilton.
- Espectrofotómetro visible con rangos de detección de 820 nm o mayor.
- Tubos de vidrio, gradillas, pipetas de vidrio con propipeta para ácidos.
- Vortex.

Muestras

Extracto lipídico conteniendo 30-40 nmoles de fósforo.

Consideraciones generales:

Toda el agua que se utilice para preparar los reactivos debe ser desmineralizada y bidestilada o de tipo ultrapura (que cumpla con las normas ASTM I[2], ver tabla). Todo el material de vidrio debe ser lavado previamente, enjuagado y mantenido unas horas en HCl 10%, o alternativamente en solución sulfocrómica[3]. Posteriormente, debe ser enjuagado con agua desmineralizada y finalmente con agua desmineralizada/ bidestilada o ultrapura. Todos los tubos de vidrio deben provenir del mismo fabricante, similares en material y forma e idealmente del mismo lote de producción. Los volúmenes de extractos lipídicos deben ser medidos con pipetas de desplazamiento positivo o microjeringas Hamilton.Tanto las pipetas como las microjeringas deben ser lavadas con el

1. Como alternativa económica al baño de arena comercial se puede utilizar una hornilla portátil de inducción.
2. ASTM=American Society for Testing and Materials (www.astm.org)
3. La solución sulfocrómica se prepara de la siguiente manera: disolver 15 gr dicromato de potasio en 100 mL de agua, agregar 0.5 lt de ácido sulfúrico. Guardar en frasco oscuro a temperatura ambiente. La solución es reusable hasta que empiece a virar a color verde.

solvente puro entre cada aplicación de muestra. El baño de arena debe ser calibrado previamente para determinar la zona de temperatura constante, partiendo del centro del recipiente en el que está contenida la arena. Los tubos deberán colocarse sólo en la zona de temperatura constante, y a la misma profundidad.

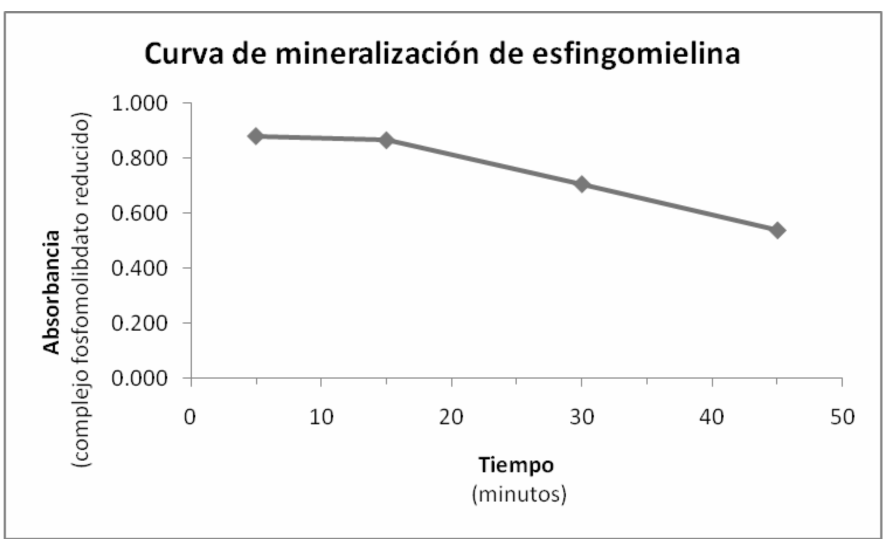
Agua para uso en laboratorio

Tipo ASTM	I	II	III	IV
Conductividad a 25ºC (micromhos/cm)	0.056	1.000	4.000	5.000
Resistencia a a 25ºC (megaohms/cm)	18.200	1.000	0.250	0.200
Sílica total (μg/L)	3.000	3.000	500.000	
Carbono orgánico total (μg/L)	50.000	50.000	200.000	
Cloruros (μg/L)	1.000	5.000	10.000	50.000
Sodio (μg/L)	1.000	5.000	10.000	50.000
pH*				5 - 8

(*) No es posible realizar la medición de pH en los tipos de agua I-III en los pHmetros con electrodos convencionales, ya que éstos no están diseñados para medir el pH en soluciones de bajo contenido iónico. Además, esta determinación es irrelevante, ya que los componentes presentes en estos tipos de agua no son suficientes como para alterar el pH.

La temperatura óptima para la evaporación del solvente en las muestras deberá ser determinada para cada situación particular. Ésta dependerá del grosor del vidrio del tubo a utilizarse así como de la altura y del diámetro de éste. Es importante que durante la evaporación no se produzca una salida violenta del solvente hacia la boca del tubo.

De igual manera, el tiempo óptimo de mineralización deberá ser determinado tomando en cuenta lo descrito para la temperatura de evaporación en el párrafo anterior. La hidrólisis de esfingomielina permite calibrar el tiempo de mineralización óptimo en las condiciones de cada laboratorio (ver gráfico).



En el gráfico se muestra la absorbancia del complejo fosfomolibdato reducido (equivalente al fósforo inorgánico liberado de la esfingomielina) en función del tiempo de hidrólisis a 190 °C. Se observa que entre 5 y 15 minutos de hidrólisis no se produce pérdida en el fósforo detectado.

Procedimiento

Muestra de extracto lipídico (o estándar) en tubo por triplicado. Por cada grupo de determinaciones realizar una curva de calibración utilizando 5, 10, 20 y 40 nmol de P (5, 10, 20 y 40 μL del estándar diluido). Completar la muestra y estándar al máximo volumen con agua ultrapura (ver ejemplo adelante). La curva debe incluir adicionalmente un blanco de reactivos y un blanco de tubo, como control de la calidad de lavado del material. Evaporar a 100 - 160 °C en estufa[4], luego agregar 80 μL de reactivo de mineralización (en el fondo del tubo). Vorterear.

↓ Colocar en baño de arena (190 °C) durante 10-15 minutos[5] (asegurarse que todos los tubos estén sumergidos a la misma profundidad). Secar y dejar enfriar.

↓ Agregar 300 μL de agua ultrapura, enjuagando las paredes del tubo. Vorterear.

↓ Agregar 1.3 mL de reactivo de color. Vorterear.

↓ Incubar 1 hora a 37 °C en baño de agua. Enfriar y leer a 820 nm. El color de la reacción es estable por varias horas.

---

4. La temperatura óptima para la evaporación deberá ser determinada para cada situación particular (ver lo especificado bajo *Consideraciones generales*).
5. El tiempo de mineralización deberá ser determinado para cada situación particular(ver lo especificado bajo *Consideraciones generales*).

Experimento 2: Determinación de P de fosfolípidos de un extracto lipídico obtenido de eritrocitos humanos

Se utilizan extractos lipídicos obtenidos a partir de eritrocitos humanos, en una concentración de 29 mL de extracto por mL de eritrocitos. Los extractos fueron preparados de acuerdo a lo descrito en el capítulo 4.

Las muestras y los estándares son determinados por triplicado. Se coloca concentraciones crecientes de estándar y 48 μL de muestra de extracto lipídico, según la siguiente tabla:

Tubo*	Estándar/ Muestra	Agua Ultrapura	Vorterear	Evaporar 100°C	Reactivo Minerali- zación	Vorterear	Baño Arena190°C	Agua Ultrapura	Reactivo Minerali- zación	Vorterear	Baño Agua 37°C	Enfriar. Leer a 820nm
Blanco	-	48 μL			80 μL			300 μL	1.3 mL			
E1	5μL	43 μL			80 μL			300 μL	1.3 mL			
E2	10μL	38 μL			80 μL			300 μL	1.3 mL			
E3	20μL	28 μL			80 μL			300 μL	1.3 mL			
E4	40μL	8 μL			80 μL			300 μL	1.3 mL			
M1	48μL	-			80 μL			300 μL	1.3 mL			
M2	48μL	-			80 μL			300 μL	1.3 mL			
M3	48μL	-			80 μL			300 μL	1.3 mL			
M4	48μL	-			80 μL			300 μL	1.3 mL			

(*) E= estándar; M= muestra de extracto lipídico

Resultados esperados

Se obtienen los siguientes datos:

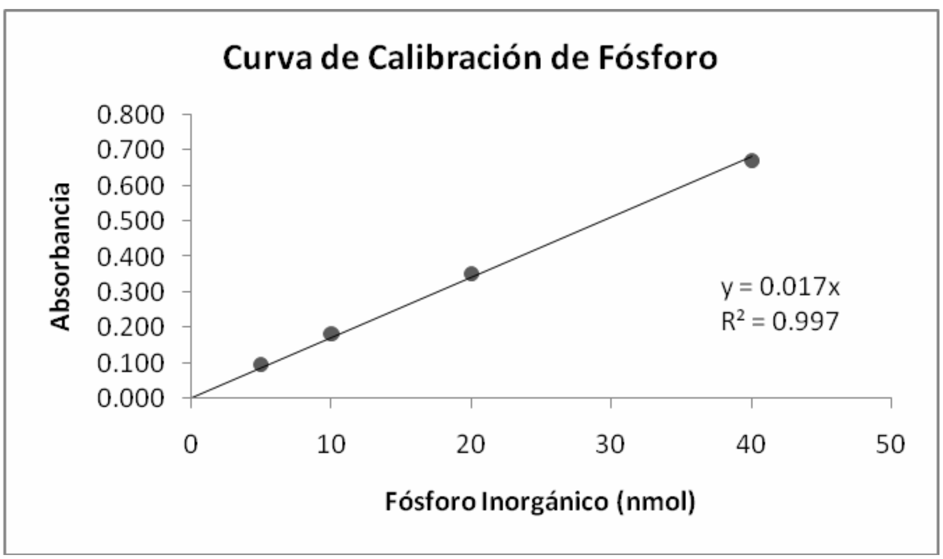
A. Curva estándar

nmol PI	Absorbancia (triplicado)			Promedio	Absorbancia restando el blanco
	1	2	3		
blanco	0.021	0.020	0.022	0.021	-
5	0.117	0.119	0.122	0.119	0.098
10	0.207	0.208	0.197	0.204	0.183
20	0.368	0.373	0.382	0.374	0.353
40	0.690	0.719	0.668	0.692	0.671

B. Muestras

C. Cálculos

Se grafica la curva estándar y se obtiene la ecuación de la recta. Este procedimiento se puede realizar con cualquier programa estadístico, o con hojas de cálculo como Microsoft Excel (Microsoft Corporation, EEUU).



Muestras
M1
M2
M3
M4

Cálculo de la concentración de fósforo inorgánico en 48 μL de muestra:

nmol Pi = Abs / 0.017

La concentración de fósforo inorgánico por volumen de eritrocitos se calcula en base al volumen total del extracto obtenido de 1 mL de eritrocitos:

$$\mu\text{mol Pi/mL eritrocito} = \frac{\text{nmol Pi x } 29\text{x}10^3 \mu\text{L}}{48\ \mu\text{L}}$$

Entonces, para las muestras analizadas, se obtiene lo siguiente:

Muestras	Absorbancia restando el blanco	nmolPi/ 48 μL extracto	volumen de extracto/ mL eritrocito	μmol Pi/ mL eritrocito
M1	0.118	6.94	29	4.19
M2	0.121	7.10	29	4.29
M3	0.111	6.55	29	3.96
M4	0.132	7.76	29	4.69

Referencias bibliográficas

1. HESS, H. H., DERR, J.E. Assay of inorganic and organic phosphorus in the 0.1-5 nanomole range. *Anal. Biochem.* 1975; 63(2):607–613.
2. CHEN, P.S., TORIBARA, T.Y., WARNER, H. Microdetermination of phosphorus. *Anal. Chem.* 1956; 28:1756-58.
3. AMES, B.N. Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases. *Methods Enzymol.* 1966; 8:115–118.

NOTAS

Capítulo 6

Determinación de colesterol libre en extractos lipídicos de membranas biológicas

Carla Gallo

Introducción

El colesterol es un componente muy importante de la membrana plasmática en los animales, siendo la forma predominante el colesterol anfipático (denominado colesterol libre, ver capítulo 1). Es posible determinar el contenido de colesterol libre por diversos métodos cromatográficos como cromatografía de gases, de alta performance (HPLC), de capa fina (TLC) y de fluido supercrítico (SFC), tal como lo describe Hoving [1]. Sin embargo el método más simple y rápido es el enzimático colorimétrico que se utiliza para la determinación de colesterol total en plasma o suero[2]. Este método requiere que el colesterol se encuentre en forma soluble en el medio acuoso del ensayo, haciéndose accesible a la acción de las enzimas. Las moléculas detergentes tienen la capacidad de solubilizar la estructura de bicapa de la membrana, formando micelas[3]. En consecuencia, para poder cuantificar el colesterol de membranas, se hace necesario utilizar detergentes. El punto crítico es solubilizar el colesterol sin que la actividad de las enzimas del ensayo se vea afectada por este proceso. De Hoff et al.[4] propusieron utilizar el detergente no iónico Triton X-100 para solubilizar el colesterol de las membranas, dado que la actividad de las enzimas necesarias para el ensayo colorimétrico no se altera por este procedimiento[5].

Fundamentos:

El método se basa en la solubilización de la membrana con el detergente no iónico Triton X-100 y la subsecuente determinación del colesterol libre mediante un kit enzimático que contiene a las enzimas colesterol oxidasa y peroxidasa, además de los reactivos necesarios, dándose las siguientes reacciones (método de Richmond[2]; según lo descrito por Allain et al.[6] y De Hoff et al. [4]:

$$\text{Colesterol} + O_2 \xrightarrow[\text{colesterol oxidasa}]{} \text{colesten-3-ona} + H_2O_2$$

$$H_2O_2 + \text{aminofenazona} + \text{fenol} \xrightarrow[\text{peroxidasa}]{} \text{quinona coloreada} + H_2O$$

La quinona coloreada es luego determinada colorimétricamente a 505 nm.

Reactivos

1. Kit enzimático. Conservar a 4-8 ºC.
2. Tritón X-100. 2.5% en Cl_3CH. Conservar a 0 ºC o menos.
3. Estándar de colesterol (Sigma C-3292). 1 mg/mL en Cl_3CH. Conservar a 0 ºC o menos.

Equipos y material de laboratorio

- Cilindro de N_2 grado cromatográfico
- Agujas de acero inoxidable para burbujear nitrógeno.
- Baño de agua a 37 ºC.
- Espectrofotómetro.
- Tubos, gradillas, vortex.

Muestras

Extracto lipídico conteniendo 25-75 μg de colesterol.

Consideraciones generales

Todos los reactivos deben ser llevados a temperatura ambiente antes de su uso. Los volúmenes de extractos lipídicos deben ser medidos con pipetas de desplazamiento positivo o microjeringas Hamilton. Tanto las pipetas como las microjeringas deben ser lavadas con el solvente puro entre cada aplicación de muestra.

Procedimiento

↓ Colocar el extracto lipídico (muestra) en un tubo de ensayo. Preparar una curva estándar con 10, 20 y 40 μL de estándar de colesterol. La curva debe incluir adicionalmente un blanco de reactivo.

↓ Evaporar el solvente bajo nitrógeno (la evaporación se puede acelerar colocando los tubos en baño de agua a 37 ºC).

- Agregar 100 μL de Tritón X-100 al 2.5% en cloroformo. Evaporar nuevamente bajo nitrógeno.
- Agregar el reactivo de colesterol y dejar reaccionar de acuerdo a las instrucciones del kit enzimático.
- Leer la absorbancia a 505 nm.

Experimento 3: Determinación de colesterol total en extractos lipídicos de eritrocitos humanos

Se utilizan extractos lipídicos preparados a partir de eritrocitos humanos, en una concentración de 29 mL de extracto por mL de eritrocitos. Los extractos fueron preparados de acuerdo a lo descrito en el capítulo 4.

En este experimento se utiliza el kit para determinación de colesterol Colestat Enzimático AA de Wiener Lab (Rosario, Argentina).

Preparar el reactivo de trabajo de acuerdo a las instrucciones del kit.

Se trabaja con un volumen de muestra de 200 μL de extracto lipídico equivalente a 25-75 μg de colesterol.

Colocar estándares y muestras por triplicado, de acuerdo a lo indicado en la siguiente tabla:

<table>
<tr><td>Tubo*</td><td>Estándar</td><td>Muestra</td><td rowspan="6">Evaporar NN_2.</td><td>Tx100</td><td rowspan="6">Evaporar N_2.</td><td>Reactivo Trabajo</td><td rowspan="6">30min 37 ºC</td><td rowspan="6">Enfriar Leer a 505 nm</td></tr>
<tr><td>Blanco</td><td>-</td><td>-</td><td>100 μL</td><td>1 mL</td></tr>
<tr><td>E1</td><td>5 μL</td><td>-</td><td>100 μL</td><td>1 mL</td></tr>
<tr><td>E2</td><td>10 μL</td><td>-</td><td>100 μL</td><td>1 mL</td></tr>
<tr><td>E3</td><td>20 μL</td><td>-</td><td>100 μL</td><td>1 mL</td></tr>
<tr><td>M</td><td></td><td>200 μL</td><td>100 μL</td><td>1mL</td></tr>
</table>

(*) E= estándar; M= muestra de extracto lipídico; Tx100=Triton X-100

La reacción es estable durante 30 minutos.

Resultados esperados

Se obtienen los siguientes datos:

A. Curva estándar:

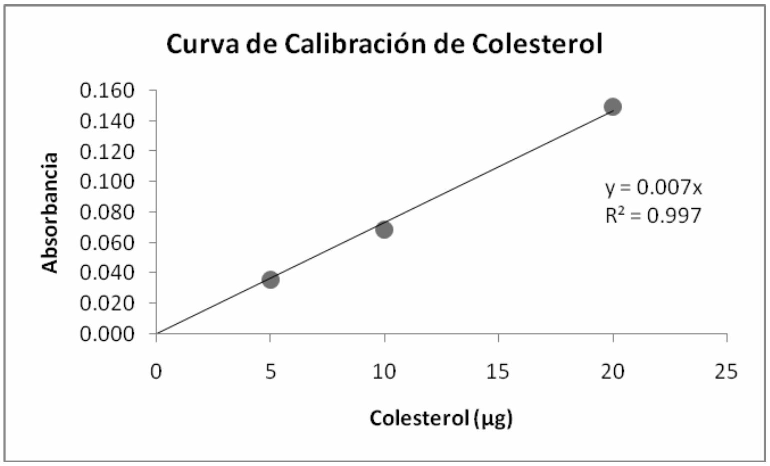
μg colesterol	Absorbancia vs. blanco (triplicado)			Promedio
	1	2	3	
5	0.038	0.033	0.036	0.036
10	0.075	0.063	0.068	0.069
20	0.152	0.142	0.155	0.150

B. Muestras:

Muestras	Absorbancia vs. blanco (triplicado)			Promedio
	1	2	3	
M1	0.066	0.058	0.061	0.062
M2	0.078	0.089	0.081	0.083
M3	0.047	0.055	0.05	0.051

C. Cálculos

Se grafica la curva estándar y se obtiene la ecuación de la recta. Este procedimiento se puede realizar con cualquier programa estadístico, o con hojas de cálculo como Microsoft Excel (Microsoft Corporation, EEUU).



Cálculo de la concentración de colesterol en 200 μL de muestra:

μg colesterol = Abs / 0.007

La concentración de fósforo inorgánico por volumen de eritrocitos se calcula en base al volumen total del extracto obtenido de 1 mL de eritrocitos:

$$\text{mg colesterol / mL eritrocito} = \frac{\mu\text{g colesterol x } 29\text{x}10^3\,\mu\text{L}}{200\,\mu\text{L}}$$

Entonces, para las muestras analizadas, se obtiene lo siguiente:

Muestras	μg colesterol/ 200 μL extracto	volumen de extracto/ mL eritrocito	mg colesterol/ mL eritrocito	μmol colesterol/ mL eritrocito
M1	8.81	29	1.28	3.31
M2	11.81	29	1.71	4.42
M3	7.24	29	1.05	2.72

Referencias bibliográficas

1. HOVING, E.B. Chromatographic methods in the analysis of cholesterol and related lipids. *J. Chromatogr B*, 1995; 671(1-2): 341-362.
2. RICHMOND, W. Use of cholesterol oxidase for assay of total and free cholesterol in serum by continuous-flow analysis. *Clin. Chem.*, 1976; 22(10):1579 - 1588.

3. HELENIUS, A., SIMONS, K. Solubilization of membranes by detergents. *Biochim Biophys Acta*. 1975; 415(1):29-79.
4. DE HOFF, J. L., DAVIDSON, L.M., KRITCHEVSKY, D. An enzymatic assay for determining free and total cholesterol in tissue. *Clin. Chem.* 1978; 24(3):433-435.
5. RICHMOND, W., Preparation and properties of a cholesterol oxidase from *Nocardia sp.* and its application to the enzymatic assay of total cholesterol in serum. *Clin. Chem.* 1973; 19(12):1350-1356.
6. ALLAIN, C.C., POON, L.S., CHAN, C.S.G, RICHMOND, W., Fu, P.C. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin. Chem.* 1974; 20(4):470-475.

Notas adicionales:

Solubilización y dispersión de lípidos

La elección del surfactante y la cantidad del mismo para solubilizar lípidos está basada en prueba y error (este proceso es dependiente del tipo de extracto y del material de origen). Al trabajar es importante considerar dos variables:

a. La concentración del detergente.
b. La relación lípido/detergente.

Veamos entonces algunas observaciones prácticas que facilitan la solubilización de lípidos:

1. Cuanto mayor sea la concentración del detergente en agua es mejor, también se requiere más detergente que lípido, un buen punto de partida es una relación 15:1 (puede pesarse el extracto desecado para establecer la relación de cantidades).
2. Cuanto más polar sea el lípido menos detergente se requiere.
3. La mezcla puede ser calentada (50 °C), vortereada o sonicada hasta lograr una emulsión clara y transparente.

Los detergentes más conocidos son: Triton X-100, Lubrol WX, Tween 20, Nonidet P-40, desoxicolato de sodio, taurocolato de sodio.

Observaciones:

Recordar que los surfactante ejercen una pronunciada influencia sobre las velocidades de hidrólisis de sustratos por enzimas.

Los surfactantes no iónicos pueden contener contaminaciones con fosfato que interfieren en la determinación de Pi en FL.

Bibliografía

Supelco Inc. Handbook of lipids and selected carbohydrates 5th Ed, Bellefonte, Pennsylvania, USA. 1979:52
HELENIUS, A. and SIMONS, K. Solubilization of membranes by detergents. *Biochem.Biophys.Acta* 1975; 415:29-79.

NOTAS

Capítulo 7

Separación de lípidos neutros y polares por cromatografía de capa fina (TLC)

Joaquín V. Rodríguez

Fundamentos

Los lípidos de membranas incluyen dos grupos de lípidos: los lípidos no polares o neutros (LNP) que incluyen aquellos lípidos que no contienen azúcares ni fósforo en su molécula (CO, CO-E, TG, DG, MG, AGL y AGME) y los lípidos polares (LP). Con la excepción del CO, los LNP son componentes menores de las membranas (como los glicolípidos en el grupo de los LP). Los LNP asociados a membranas no son a menudo parte de la estructura sino que han quedado atrapados en el espacio interior de las vesículas de membranas durante su obtención. Como por ejemplo los TG que puedan aparecer cuando se obtienen membranas de retículo endoplásmico y de Golgi de hígado[1]. Debido a la complejidad de la composición de los extractos de lípidos de biomembranas, al presente no existe un sistema cromatográfico que permita separar todas las clases de lípidos en una operación, por ello es necesario utilizar distintos sistemas o alternativamente realizar un fraccionamiento preliminar en distintos grupos para luego analizarlos en particular. Por ejemplo, en el caso de necesitarse obtener los LNP y otros LP en escala semicuantitativa puede utilizarse una columna de vidrio con silicagel como adsorbente realizando así una cromatografía de adsorción en columna:

En una pipeta pasteur de vidrio se inserta una pequeña torunda de lana de vidrio que actúa como filtro para retener el adsorbente. Luego se le agrega 1 g de silicagel y se compacta mediante golpes laterales suaves. Sobre la sílica se pueden sembrar hasta 30 mg de lípidos y luego eluir las siguientes fracciones:

Con 10 mL de éter etílico se obtienen los LNP.
Con 10 mL de MetOH se obtienen los FL.
Con 10 mL de acetona se obtiene la fracción GLP

Luego cada fracción será separada en sus componentes mediante TLC u otra metodología.

En este curso utilizaremos una de las técnicas más difundida, económica y particularmente versátil que permite separar mezclas de lípidos, la

cromatografía en capa fina (TLC). Entre sus ventajas podemos decir que requiere de equipamiento mínimo y simple, que pueden analizarse rápidamente un gran número de muestras, que las clases de lípidos pueden separarse, identificarse y cuantificarse con los métodos apropiados. También puede ser utilizada como método preparativo para aislar cantidades de lípidos, los que pueden ser recuperados de la placa para su posterior análisis. En este capítulo consideraremos aspectos prácticos del uso de la TLC ascendente en placas de vidrio con silicagel G como adsorbente en la separación de clases de LNP y LP, se plantean también las estrategias para su identificación mediante estándares y reactivos para su tinción específica. En los capítulos 8 y 10 se considerará el uso de la TLC mono y bidimensional para la separación, identificación y cuantificación de distintas clases de FL.

El procedimiento utilizado en TLC es simple, consiste en aplicar la mezcla de lípidos obtenida de la extracción, sobre una capa fina de adsorbente que cubre un soporte de vidrio. El punto de aplicación se denomina punto de siembra u origen y la mezcla es separada en sus componentes por migración diferencial cuando una fase líquida de solvente asciende a través del origen por acción capilar. Para un dado sistema de solvente, cada lípido tendrá una movilidad característica que se describe por su Rf (factor de retardo o migración relativa) que se calcula como:

$$Rf = \frac{\text{distancia recorrida por la muestra (d1)}}{\text{distancia recorrida por el solvente (d2)}}$$

Debido a que los lípidos generalmente no son coloreados será necesario visualizarlos mediante una reacción química, la que no sólo permite identificarlos sino también determinar su Rf para el sistema de solventes elegido.

El adsorbente más usado para el análisis de lípidos por TLC es la Silicagel G, que es un material sintético (sílica que incluye $CaSO_4$ como aglutinante), el tamaño de partícula estándar de silicagel es de 10-15 μm y contiene poros de un diámetro definido, que en nuestro caso será de 60 Å. Debido a que la silicagel puede absorber agua, el contenido de la misma determinará la polaridad del adsorbente y por lo tanto sus propiedades cromatográficas. Por estas razones el contenido de agua debe ser estrictamente controlado. Normalmente la placas se activan colocándolas en estufa 30 minutos a 110 °C antes de usarlas. El soporte más conveniente para el análisis de lípidos en TLC es el vidrio porque es resistente a los químicos usados en los sistemas de solventes y a las tinciones específicas, también permite la realización de la densitometría. Las placas precubiertas con el adsorbente están disponibles en tamaños de 20 x 20 cm o 20 x 10 cm, la forma más económica es adquirir la placa de 20 x 20, colocarlas sobre un papel con el adsorbente boca abajo y cortarlas con un cortavidrio en 4 placas de 10 x 10 cm. También pueden usarse placas cuyo soporte sea aluminio o plástico pero hay que considerar que son menos resistentes a la abrasión que las de vidrio. A los fines de obtener resultados más reproducibles conviene siempre comprar las placas ya confeccionadas (precubiertas) y no hacerlas en el laboratorio.

En su forma normal, la silicagel G es un adsorbente polar, por ello los LP se adsorberán fuertemente a la sílica cuando sean sembrados en ella. En cambio los LNP migrarían más rápidamente (Rf mayor) que los polares (Rf menores). Si para desarrollar la cromatografía se incrementa la polaridad del sistema de solventes (fase móvil), se puede aumentar los Rf de los componentes de la mezcla. Para separar LNP, la fase móvil contiene generalmente hexano, éter dietílico y ácido AcH o ácido Fórmico, las separaciones pueden realizarse usando una o dos mezclas de solventes.

Separación usando 1 sistema de solventes[2]

Una opción es separar los LNP en placas de silicagel G utilizando la fase móvil: heptano: éter etílico: AcH (60:40:2) (v/v/v). Para este caso en particular se obtendrá la migración de los LNP en el siguiente orden: CO-E > TG > AG > DG >CO > MG > FL. La separación de CO y MG es pobre. Los FL y GL permanecen en el origen de siembra.

Separación usando dos sistemas de solventes[3]

La separación de LNP puede ser mejorada desarrollando la placa a una distancia determinada con una primera fase móvil muy polar con el objeto de separar las sustancias polares [Hexano:Heptano:Eter etílico:AcH (63:18.5:18.5:1, v/v/v/v)], luego la placa es secada bajo corriente de aire caliente y desarrollada con una segunda fase móvil menos polar (Cl_4C) que se corre en el largo entero de la placa con el propósito de resolver la separación de las sustancias no polares. Este sistema se ejemplifica en el experimento incluido al final del capítulo.

Aplicación de las muestras en la placa cromatográfica

En la TLC, la muestra de extracto puede aplicarse como un punto (spot) o una línea (streak), el tamaño de ambos dependerá del uso posterior de la placa; si la cromatografía será preparativa o tendrá fines densitométricos. En el primer caso, en una placa de 20 x 20 cm se puede sembrar como spot de 20 - 80 μg de lípidos y como línea completa hasta 5 mg de lípidos. En el segundo caso en una placa de 20 x 10 o de 10 x 10 cm, el spot no debe ser mayor a 2 mm y la línea a 5 mm. En la siembra es importante no dañar la superficie de la placa ni contaminarla con los dedos del operador. En lo posible usar como solvente de las muestras aquellos solventes no polares ya que favorecen una zona de siembra más pequeña en el punto de aplicación de la muestra, lo que mejora la resolución de la cromatografía. Respecto a la cantidad de muestra a sembrar es importante considerar la concentración de la misma para obtener una buena resolución posterior.

La concentración de la muestra debe estar en el rango 0.1 - 1% (ideal 0.5 %), esto se corresponde a 1 - 10 μg de lípido por μL de muestra. Ejemplo: si tenemos

una sustancia cuyo límite de detección es bajo, deberíamos sembrar 20 μg, si la concentración es 1 % = 10 μg/μL, será necesario sembrar 2 μL. En cambio si la concentración es de 0.1 % = 1 μg/μL, tendríamos que sembrar 20 μL lo cual no es conveniente a los fines de resolución de la muestra porque el tamaño de la siembra será grande. Tampoco es conveniente recargar la zona de siembra ni concentrar demasiado la muestra porque se produce el sangrado (superposición de bandas) en la separación de los componentes.

Cámaras para TLC

Las cámaras para TLC son construidas con vidrio y es indispensable que el fondo de la misma sea plano y tenga una tapa de vidrio con bordes esmerilados a fin de impedir la evaporación de la fase móvil. Se pueden adquirir en el comercio o sino construirlas cortando la parte superior de un ladrillo de vidrio, en este caso es necesario que se esmerile la superficie cortada para obtener un buen cierre de la tapa.

Desarrollo del cromatograma

Preparar los solventes día a día. No usar la fase móvil más de una vez.
Lavar la cámara inmediatamente después de desarrollar una cromatografía y secarla en estufa.
Dejar equilibrar los solventes en la cámara.
Cubrir con papel los laterales de la cámara, solamente cuando sea necesario (no cuando el hexano o éter etílico estén incluidos en la fase móvil).
El solvente en la cámara no debe superar el punto de siembra, porque disolvería la muestra.

Estándares de lípidos para TLC

Los estándares de lípidos para TLC deben disolverse en solventes cuyo punto de ebullición sea el más alto posible (dentro del rango de polaridades adecuadas), con ello se reduce a un mínimo la evaporación del solvente durante el llenado de capilares o microjeringas usados para sembrar la muestra. A tal efecto en la Tabla 1 se presenta una lista de solventes de polaridad creciente con sus respectivos puntos de ebullición y sus alternativas. Los estándares deben ser disueltos en solventes con BHT y ser almacenados en pequeños volúmenes en ampollas de vidrio neutro color oscuro cerradas en atmósfera de N_2, a - 20 ºC, de esta manera se los preserva de la oxidación.

En la tabla 2 se presentan algunas propiedades de los lípidos más comunes que pueden ser utilizados como estándares, ellos han sido obtenidos de textos y manuales comerciales (Supelco). Se agregan las técnicas de conservación utilizadas por los autores del texto.

Tabla 1: solventes utilizados para almacenar estándares de lípidos

	solvente	P. Eb. (ºC)	Cte. Dieléctrica (D)	Solvente alternativo	P. Eb. (ºC)	Cte. Dieléctrica (D)
				n-pentano	36	1.84
a	heptano	98	1.92	éter de petróleo	40-60	
				n-hexano	69	1.88
				éter etílico	35	4.3
b	tolueno	111	2.4	éter diisopropílico	68	3.9
				benceno	80	2.3
c	1,2 dicloroetano	83	10.4	Cl_2metileno	40	8.9
				Cl_3CH	61	4.8
d	acetato de etilo	77	6.0	formiato de etilo	54	
				acetato de metilo	57	
e	n-propanol	97	20.3	acetona	56	21.3
	o			MetOH	65	32.7
	acetonitrilo	83	37.5	EtOH	78	24.6

Las propiedades físicas de los solventes fueron tomadas de: Zahler, P. and Niggli V. The use of Organic solvents in membrane research, in Methods in membrane biology, Vol. 8, Korn, E.D. Ed. New York, Plenum Press, 1977: 1-50.
The Merck Index, 12th Ed. Merck & Co Inc. Boudavari S. Ed. USA, Whitehouse Station, N.J. 1996.

Sistemas de detección[4]

Una vez que la cromatografía ha sido desarrollada, las placas deben ser tratadas o teñidas para revelar la posición de los lípidos. En general las tinciones pueden ser clasificadas en dos categorías, tinciones generales que permiten visualizar prácticamente todos los lípidos de manera no específica y los ensayos o tinciones específicas para determinados lípidos. Las tinciones generales pueden ser divididos en dos categorías, ensayos destructivos y no destructivos de la muestra. Los primeros conducen a la destrucción de la muestra, en cambio los segundos nos permiten recuperar la muestra para subsiguientes análisis (en el caso del reactivo 4, el mismo deberá ser extraído de la muestra eluyendo con éter de petróleo antes de continuar su análisis).

Las tinciones deben ser aplicadas en una fina dispersión (spray) sobre la placa, para ello se usan atomizadores construídos en vidrio, que utilizan aire comprimido o más apropiadamente N_2. También en ciertos casos las placas pueden ser sumergidas en el reactivo de tinción (dipping). Como prácticamente

todos los reactivos usan ácidos o álcalis fuertes y solventes peligrosos es importante realizar estas operaciones bajo campana de extracción y con máscara de protección para el operador. Una vez revelados las posiciones de los lípidos se determinan los respectivos Rf o se someten las placas a densitometrías.

Tabla 2: propiedades de lípidos usados como estándares para TLC

Lípido	origen	PM	% Pi	propiedades
Fosfatidilcolina (PC) (Lecitina)	huevo	787*	3.93	Sustancia higroscópica, expuesta a luz y aire se oxida. Soluble en MetOH, EtOH, benceno, éter etílico, n-hexano, Cl_3CH, Cl_4C, CS_2. Poco soluble en piridina, glicerol, AcH. Insoluble en acetona y acetato de metilo. Conservación: en solución en Cl_3CH a - 20 ºC.
Fosfatidiletanolamina (PE)	huevo	744*	4.16	Polvo blanco tendencia a oscurecer por exposición al aire y luz. Soluble en Cl_3CH, éter de petróleo, EtOH, CS_2, benceno, AcH caliente y éter etílico saturado con H_2O. Insoluble en éter etílico anhidro y en acetona, forma emulsión con el H_2O. Conservación: en solución en Cl_3CH a - 20 ºC.
Fosfatidilserina (PS)	bovino	788*	3.93	Polvo blanco liviano, tiene tendencia a oscurecerse, contienen pequeñas porciones de H_2O en la molécula. Soluble en Cl_3CH, éter etílico y éter de petróleo. Insoluble en EtOH, MetOH y acetona. Conservación: en solución en Cl_3CH a - 20 ºC.
Fosfatidilinositol (PI)	plantas	856	3.62	Polvo blanco higroscópico. Soluble en Cl_3CH Insoluble en EtOH, acetona y H_2O. Conservación: en polvo o en solución en Cl_3CH a -20 °C
Esfingomielina (SM)	bovino	749**	4.13	Polvo cristalino blanco relativamente estable a la luz y aire. Soluble en benceno, Cl_3CH, EtOH tibio y acetato de etilo caliente. Insoluble en éter etílico y acetona. Conservación: en polvo a 4 °C, en solución en en Cl_3CH a 4 °C.
Cardiolipina (CL)	bovino	1473**	4.21	Polvo blanco. Soluble en benceno, etanol, cloroformo, hexano:EtOH (9:1), tolueno 95%. Insoluble en MetOH, acetona, H_2O. Conservación: en polvo por debajo de - 20 ºC.
Lisofosfatidilcolina (LPC)	huevo	508#	6.10	Polvo blanco. Soluble en Cl_3CH/MetOH (2:1), H_2O. Insoluble en dietiléter, acetona. Conservación: en polvo a -20 ºC

Lisofosfatidiletanolamina (LPE)	huevo	463	6.70	Polvo blanco. Soluble en $Cl_3CH/MetOH/H_2O$ (2:1:0.1), $Cl_3CH/MetOH$ (1:1), H_2O. Insoluble en acetona. Conservación: en polvo a -20 ºC.
Lisofosfatidilserina (LPS)	Bovino/ porcino	508	6.09	Polvo blanco. Soluble en $Cl_3CH/MetOH/H_2O$ (10:1:0.1), $Cl_3CH/MetOH$ (1:1), H_2O. Insoluble en acetona. Conservación: en polvo a -20 ºC.
Ac. Fosfatídico (PA)	Síntesis	744*	4.43	Sólido blanco. Soluble en Cl_3CH, tolueno. Insoluble en acetona, MetOH, EtOH, H_2O. Conservación: -20 °C
Sulfátidos (SF)	Bovino/porcino	894[i]	3.50	Polvo blanco. Soluble en $Cl_3CH/MetOH$ (2:1), $Cl_3CH/MetOH/H_2O$ tibio (2:1:0.1).Insoluble en H_2O, solventes orgánicos no formadores de puentes de hidrógeno. Conservación: -20 °C
Cerebrósidos (CE)	Bovino/porcino	728[i]	1.69	Polvo blanco. Soluble en EtOH caliente, piridina. Insoluble en acetona, dietil éter Conservar a -20 °C
Colesterol (CO)	sintesis	386.67	-	Polvo blanco. Solubilidad (mg/mL): MetOH (5.82), EtOH (17.9) a 18 °C, acetona (23.96), éter etílico (357), Cl_3CH (222), muy soluble en benceno y éter de petróleo. Conservar a temperatura ambiente.
Colesterol acetato (CO-Acetato)	sintesis	428.71	-	Polvo cristalino blanco. Soluble en éter etílico, Cl_3CH y éter de petróleo. Soluble (mg/mL): en acetona (25) y en EtOH (5). Conservar a -20 °C.

PM: peso molecular, * basado en la forma dioleica, ** basado en la forma estearoleica, # basado en la forma palmitoil, [i] basado en la forma monogalactosil-esteárica.
Las propiedades físicas y solubilidades de los lípidos fueron tomadas de :
Zahler, P. and Niggli V. The use of Organic solvents in membrane research, in Methods in membrane biology, Vol. 8, Korn, E.D. Ed. New York, Plenum Press, 1977: 1-50.
The Merck Index, 12th Ed. Merck & Co Inc. Boudavari S. Ed. USA, Whitehouse Station, N.J. 1996.
Supelco - Handbook of lipids and selected carbohydrates. 5th Ed. Supelco Inc. Bellefonte, Pennsylvania, 1979.

Tinciones generales para lípidos

1. *Vapores de I_2:* (ensayo no destructivo)[5], se colocan cristales de I_2 en cuba para revelado y se dejan saturar con los vapores, luego se coloca la placa de cromatografía unos minutos en la cámara y los lípidos aparecen como manchas de color marrón.

2. *Charring con H_2SO_4:* (ensayo destructivo)[5], rociar la placa con H_2SO_4 10% y luego calentar en plancha de calentamiento o estufa 15 minutos a 150 ºC, los lípidos aparecen como manchas oscuras. Es posible hacer densitometría para cuantificar.

3. *Rvo Cu/Fosfórico:* (ensayo destructivo)[6], dosa hasta 100 ng de lípidos. Util para densitometria (λ = 400 nm) (1).

Reactivo: 10% $CuSO_4$ en 8% H_3PO_4 (5.6 mL de H_3PO_4 85%, d= 1.71 csp 100 mL).

Técnica:

- colocar la estufa a 180 ºC
- calentar la placa 3 minutos a 180 ºC
- enfriar en desecador hasta temperatura ambiente
- colocar la estufa a 160 ºC
- rociar la placa con rvo Cobre/fosfórico
- calentar 15 minutos a 160 ºC
- enfriar en desecador hasta temperatura ambiente.

Revelado: los lípidos aparecen como manchas de color marrón oscuro.

4. *DPH:* (ensayo no destructivo)[7]

Reactivo: 1,6 Difenilhexatrieno (DPH) 10 mg csp 100 mL con éter de petróleo (40-60 ºC), reactivo estable 2 meses a 4 ºC en oscuridad.
Técnica: rociar la placa y secar con aire caliente.
Revelado: Los lípidos aparecen como manchas de color violeta al UV.
Nota: para remover el DPH, recromatografiar con éter de petróleo o hexano.

5. *ANS:* (ensayo no destructivo) (detecta 1 a 5 μg de FL o CO)[8]

Reactivo: 8 anilinonaftaleno-1-sulfonato, sal sódica (ANS) 0.1 % en agua.
Técnica: rociar la placa
Revelado: bajo UV 330 nm, los lípidos dan fluorescencia clara sobre fondo oscuro, si la fluorescencia se opaca, rociar con agua.

6. *BTB:* (ensayo destructivo)(5)

Reactivo: Azul de bromotimol 40 mg en 100 mL de 0.01 N NaOH
Técnica: rociar la placa
Revelado: los lípidos aparecen como manchas de color amarillas o marrón claro.

Tinciones específicas

1. Reactivo para CO y CO-E:[9]

Reactivo: disolver 50 mg $FeCl_3.6H_2O$ en 90 mL de H_2O con 5 mL de AcH y 5 mL de H_2SO_4.
Técnica: rociar la placa y calentar a 100 ºC 2-3 minutos
Revelado: CO y CO-E aparecen como manchas de color rojo-violeta.

2. Reactivo para ácidos grasos esterificados (AGME):[5]

Reactivos:

I- 10 g de Hidroxilamina.HCl en 125 mL de H_2O/EtOh (4:1, v/v).

II- 200 mL EtOH + 26 mL de NaOH saturado

A- I + II, homogeneizar y filtrar

B- moler en mortero 10 g de $FeCl_3$. $6H_2O$ en 20 mL de HCl, transferir a un frasco con 300 mL de éter dietílico y agitar.

Técnica: rociar la placa con A y secar con aire caliente, rociar con B y secar.
Revelado: los ac. grasos esterificados aparecen como manchas de color púrpura sobre fondo amarillo.

3. Reactivo para ácidos grasos libres (AGL):[9-10]
Reactivos:
I- 2′, 7′ Diclorofluoresceína 0.2 % en EtOH
II- 1 % $AlCl_3$ en EtOH
III- 1 % $FeCl_3.6H_2O$
Técnica: Rociar con I y calentar 100 ºC, luego rociar con II y calentar a 100 ºC, finalmente rociar con III y calentar a 100 ºC.
Revelado: los ácidos grasos libres aparecen como manchas de color rojo/violeta.

Reactivo: Disolver 40 mg de Verde de bromocresol en 100 mL de EtOH y agregarle 0.1 N NaOH hasta color azul.
Técnica: Si la placa ha sido desarrollada en un sistema de solventes con AcH, calentarla a 120 ºC durante 1 hora para remover trazas del AcH. Luego rociar con reactivo.
Revelado: Los AG aparecen como manchas de color azul sobre fondo amarillo.

4. Reactivo para fosfolípidos: la técnica de Vascovsky y Kotevsky[11] es extremadamente sensible para teñir lípidos que contienen fosfato.
Reactivos:
I- Disolver 16 g de Molibdato de amonio en 120 mL de agua.
II- A 40 mL de HCl concentrado agregarle 10 mL de Hg y 80 mL de I. Agitar durante 30 min. y filtrar.
III- A 200 mL de H_2SO_4 concentrado agregarle II y todo el remanente de I, completar con H_2O a 1000 mL y almacenar en botella oscura.
Técnica: Trabajar bajo campana, reactivo extremadamente cáustico y tóxico, Usar anteojos y mascarilla. Rociar la placa.
Revelado: Los fosfolípidos aparecen como manchas azules.

5. Reactivo para glicolípidos[9]***:***
Reactivo: disolver 2 g de Difenilamina en 20 mL de EtOH, agregarle 100 mL de HCl concentrado y 80 mL de AcH glacial. Homogeneizar.
Técnica: rociar la placa y calentar a 105 ºC de 15 a 30 minutos.
Revelado: los glicolípidos aparecen como manchas de color azul-grisáceo sobre un fondo gris claro.

6. Reactivo para gangliósidos[9]***:***
Reactivos:
I- disolver 2 g de Resorcinol en 100 mL de agua destilada. Almacenar esta solución stock a 4 ºC.
II- agregar 0.25 mL de solución 0.1 M de $CuSO_4$ a 80 mL de HCl concentrado.

III- agregar 10 mL de I a la solución II y completar a 100 mL con agua destilada.
Técnica: rociar la placa y calentar a 110 ºC durante unos minutos.
Revelado: los gangliósidos aparecen como manchas azul-violeta, los otros glicolipidos dan color amarillo.

Referencias bibliográficas

1. HIGGINS, J.A. Separation and analysis of membrane lipid components in: Biological embranes. A practical approach. Findlay, J.B.C. and Evans, W.W. Ed. IRL Press, Oxford, England ; 1987:111-112.
2. CHRISTIE,W.W. Adsorption column chromatography in: HPLC and Lipids. A practical guide. 2nd Ed. Oxford, Pergamon Press;1987:81-83.
3. CONTE, M.H., BISHOP, J.K.B. Nanogram quantification of nonpolar lipid classes in environmental samples by high performance thin layer cromathography. *Lipids* 1988; 23:493-500.
4. TOUCHSTONE, J.C. Visualization procedures in: Practice of thin layer chromatography. 3rd Ed. New York, John Wiley & Sons, Inc.; 1992:139-182.
5. SKIPSKI, V. P and BARCLEY, M. Thin layer chromatography of lipids in: Methods in Enzymol. Vol. XIV: Lipids, Ed. Lowenstein, J.M. Ed; 1969: 530-598.
6. WELSH, C.J. and SCHMEICHEL, K. Assays for investigations of signal transduction mechanisms involving phospholipase D: mass measurements of phosphatidate, phosphatidylethanol, and diacylglycerol in cultured cells. *Anal.Biochem*. 1991; 192:281-292.
7. HYSLOP, P.A. and YORK, D. A. The use of 1,6-Diphenylhexatriene to detect lipids on thin –layer chromatograms. *Anal.Biochem*. 1980; 101:75-77.
8. GITLER, C. Use of ANS to detect phospholipids and apolar molecules in chromatograms. *Anal.Biochem*. 1972; 50:324-325.
9. HAMILTON, R.J. and HAMILTON, S. Phospholipids in: Lipid Analysis. A practical approach. Oxford, IRL Press;1992:91-92.
10. MORRIS, K. Separation of lipid mixtures in: Techniques in Lipidology, North Holland Publishing; 1972: 441.
11. VASKOVSKY V.E. and KOTEVSKY, E.Y. Modified spray for detection of phospholipids on thin-layer chromatography. *J.Lipid.Res*. 1968; 9:396.

Experimento 4: Separación de lípidos neutros de un extracto lípidico de eritrocitos de rata en TLC monodimensional

Objetivos

a) determinar la composición de lípidos neutros de un extracto lipídico obtenido de eritrocitos de rata utilizando TLC monodimensional en dos etapas;
b) identificar cada componente por comparación de Rf con estándares;
c) identificar cada componente por tinciones específicas.

Drogas y reactivos

Cl_4C, Hexano, Heptano, Éter dietílico (Et_2O) y ácido Acético glacial (AcH).

Estándares

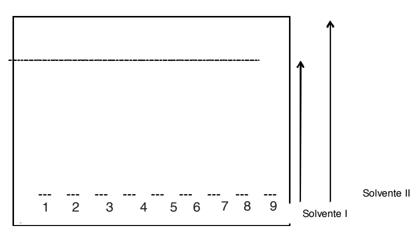
BHT 5 mg/mL, Colesterol (CO) 4 mg/mL, éster de colesterol (CO-E): CO-acetato 1 mg/mL, ácidos grasos (AG): ácido Oleico 5 mg/mL, metil ésteres de ácidos grasos (AGME): Mix RM3 Supelco 4 mg/mL, mezcla de lípidos neutros Sigma 178-1 (20% CO, 20 % CO-oleato, 20 % trioleína, 20% ácido oleico, 20% metiléster del ácido oleico) 4 mg/mL.
Reactivos para revelado e identificación (ver lista).

Materiales:

Placas de Silicagel G de 10 x 10 cm, Cubas de cromatografía, estufa, secador de cabello, desecador de vidrio.

Técnica:

- activar las placas 30 minutos a 110 ºC, luego guardar en desecador
- preparar dos cubas con los siguientes sistemas de solventes:
I- Hexano:Heptano:Éter etílico: AcH (63:18.5:18.5:1, v/v/v/v)
II- Cl_4C
dejar estabilizar al menos 20 minutos cada cuba con su tapa
- a una altura de 12 mm del borde inferior de la placa, marcar con lápiz suavemente las siguientes líneas o caminos de siembra. Se procede dejando un espacio de 7 mm en el borde izquierdo, luego se trazan 9 líneas de 5 mm separadas por espacios en blanco de 5 mm.



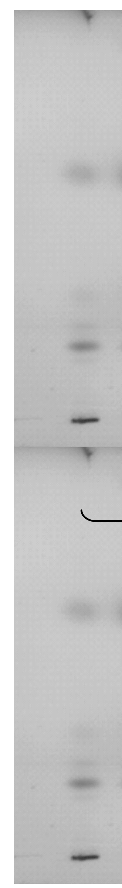
- sembrar con jeringa Hamilton en los caminos 1, 2 y 3 estándares de BHT (1 μL), CO (2 μL) y CO-E (2 μL), en el 4, 5 y 6 distintos volúmenes del extracto lipídico (2,3 y 4 μL), en 7 Sigma mix (5 μL) y en 8 y 9 estándares de ácido oleico (2 μL de dil. 1/10) y AGME (2 μL).

- correr en sistema de solventes I hasta 20 mm del borde superior
- escurrir la placa sobre papel absorbente en posición vertical (en campana de extracción) y luego secar 10 minutos con aire caliente
- correr en sistema de solventes II hasta el borde superior de la placa
- escurrir la placa sobre papel absorbente en posición vertical (en campana de extracción) y luego secar 10 minutos con secador de cabello.

Revelado: elegir alguna de las opciones presentadas en Tinciones generales para lípidos. Puede también cortarse la placa por la mitad y someter a tinciones diferenciales cada parte de la misma. Por ejemplo, correr dos placas similares, en una revelar con reactivo Cu-fosfórico en la que aparecen todos los lípidos y pueden determinarse los Rf correspondientes, a la segunda cortarla a la mitad, en la mitad izquierda revelar con tinción específica para CO y CO-E, en la mitad derecha revelar con verde de bromocresol para identificar AG.

Análisis de los resultados

En la siguiente figura se presenta la placa cromatográfica desarrollada de acuerdo a la técnica previamente descripta, en la misma se sembraron los estándares BHT, Sigma-mix (2 y 5 μL), ácido oleico y AGME, además de distintos volúmenes de un extracto lipídico de eritrocitos de rata. La placa fue revelada con la tinción Cobre-Fosfórico.



En la muestra puede evidenciarse la presencia de CO, CO-E, AG, FL y TG. Es importante destacar que los ésteres de colesterol no son componentes normales de las membranas de eritrocitos de rata como así tampoco la presencia de TG, lo que indicaría que se han arrastrado lípidos de plasma en la extracción. En la tabla correspondiente pueden observarse los Rf obtenidos para la muestra y los distintos estándares.

Notas adicionales

Elución de lípidos de la silicagel

En el caso de necesitar aislar fracciones de lípidos para realizar un análisis posterior, la separación puede realizarse en placa de 20 x 20 cm, sembrando en línea a lo largo de toda la placa, con estándares en los extremos. Para obtener las distintas fracciones, luego del desarrollo se revelará la posición de los lípidos usando un ensayo no destructivo como el I_2, la posición de las distintas fracciones se indicará marcando con lápiz el contorno de las manchas. Luego se evaporará el I_2 con corriente de aire y se raspará la silicagel con bisturí para recoger el polvo obtenido con un pincel de pelo de camello y un pequeño embudo. Una práctica común, para no perder material, es humedecer con un pequeño volumen de agua destilada la fracción a raspar, de esta manera, el material se agruma y la presencia de agua aumentaría la recuperación de solutos usando solventes no polares. La elución de los lípidos se realizará en el tubo de extracción que contiene cada fracción de sílica de la siguiente manera:

1. TG, DG y AG se extraen con 5 mL de éter etílico, agitar durante 10 min y luego centrifugar a 3000 g, el sobrenadante se transpasa con pipeta Pasteur a otro tubo, este procedimiento se realiza tres veces, reuniendo todos los sobrenadantes, los que se filtran por filtro de fibra de vidrio y luego se concentran al volumen deseado en rotavapor o por arrastre con N_2.
2. CO, CO-E y MG se extraen con 5 mL de Cl_3CH:MetOH (4:1)(v/v), incubando en baño a 40 ºC durante 10 min, luego se centrifuga y se procede como en el caso anterior.
3. FL se extraen por elución con Cl_3CH:MetOH:H_2O (5:5:1)(v/v).

Es importante analizar las recuperaciones obtenidas con el método de elución a fin de determinar que no sucedan pérdidas de material, ello puede hacerse con el agregado de lípidos radiactivos a la sílica a extraer.

NOTAS

Capítulo 8

Separación de fosfolípidos por cromatografía de capa fina (TLC) monodimensional

Giovanni Poletti y Carla Gallo

Fundamentos

La separación de fosfolípidos se basa en los fundamentos descritos en el capítulo anterior. Específicamente, siendo los fosfolípidos moléculas anfipáticas (ver capítulo 1), es posible separarlos usando una combinación de solventes orgánicos con diferentes grados de polaridad. Para la separación se utiliza también el diferente grado de interacción que presentan las cabezas polares de estos lípidos con la matriz de la placa de cromatografía (sílica gel, de naturaleza polar). La separación se da en una sola dimensión, sembrando las muestras en la base de la placa, y dejando que las moléculas sean arrastradas verticalmente junto con el solvente que sube por capilaridad a lo largo de la placa. La separación ocurre como resultado de una combinación de interacciones determinadas por la solubilidad relativa de los lípidos en los solventes y por la interacción de éstos con la matriz de la placa.

En este capítulo se presenta un método de separación monodimensional en dos etapas modificado de Skipski et al[1], en el cual se utilizan dos sistemas de solventes. Este método permite separar los principales lípidos de membrana: SM, PC, PE y PA, con excepción de PI y PS que migran como una sola mancha. En la primera etapa, el sistema de solventes (acetona/hexano) remueve los lípidos neutrales sin movilizar significativamente a los fosfolípidos. En la segunda etapa se realiza la separación de los fosfolípidos con un sistema de solventes que contiene cloroformo, metanol, ácido acético y agua.

Revelado e identificación

Una vez separados, los lípidos pueden ser detectados en las placas de TLC mediante distintos métodos de tinción. Las moléculas que actúan como reveladores reaccionan con diferentes componentes de los lípidos, como los

dobles enlaces de los ácidos grasos, el fósforo o los grupos amino de la cabeza polar. Un método altamente sensible que permite determinar hasta 100 ng de fosfolípidos en una mancha de TLC es la tinción $CuSO_4/H_3PO_4$ (ver capítulo 7). Este se basa en la interacción del sulfato de cobre con los ácidos grasos presentes en los fosfolípidos[2], y es conveniente para la cuantificación por densitometría[3].

Las diferentes especies lipídicas son identificadas en base a su migración relativa en las placas, al compararlos con muestras patrón que se incluyen en las corridas.

Cuantificación de fósforo de fosfolípidos separados por TLC

Los fosfolípidos que han sido separados por TLC pueden ser cuantificados determinando el fósforo de la cabeza polar. Para ello cada fosfolípido individual es retirado de la placa por raspado, y luego sometido al procedimiento descrito en el capítulo 5 (mineralización y posterior formación del complejo coloreado fosfomolibdato).

El revelado de los lípidos en este caso se hace mediante tinción de iodo (ver capítulo 7). No es posible utilizar el reactivo $CuSO_4/H_3PO_4$ debido a que éste tiene fósforo en su composición.

Curvas de calibración para densitometría

Otra forma de determinar la concentración de los fosfolípidos separados por TLC es la densitometría. Esta se basa en la cuantificación de la intensidad de coloración de cada mancha de fosfolípido individual, mediante los métodos que se describen en el capítulo 9. Para poder cuantificar los fosfolípidos mediante densitometría es necesario realizar curvas de calibración con cada especie de fosfolípido. Esto debido a que los diferentes fosfolípidos presentan variabilidad en la densidad detectada para masas equivalentes de cada especie (4). Existen varios factores experimentales relacionados al método de TLC que permiten lograr una detección eficiente por densitometría: uniformidad en la siembra entre muestras, una buena separación de las especies de lípidos y una adecuada sensibilidad en el método de detección (4,5).

Reactivos

1. Solventes orgánicos: Cl_3CH, MeOH, Acetona, Hexano.
2. Sistemas de solventes para la separación cromatográfica: acetona/hexano (1:3) v/v, Cl_3CH/MeOH/ác.acético/H_2O (50:25:8:2) v/v
3. Estándares de fosfolípidos: PC, PS, PI, PE, SM, LPC, LPE, disueltos en Cl_3CH-BHT 0.03%
4. Reactivo $CuSO_4/H_3PO_4$ (ver capítulo 7).

Equipo y material de laboratorio

- Placas de Silicagel G sobre vidrio de 10 x 10 cm

- Cámaras de cromatografía
- Estufa de hasta 180 ºC
- Secador de aire caliente[1]
- Cámara de vidrio con desecador activo
- Jeringas Hamilton

Muestras

Los estándares y las muestras problema deben contener de 8 a 12 nmol P en un máximo de 5 μL de solvente.

Consideraciones generales

Separación de fosfolípidos por cromatografía de capa fina (TLC) monodimensional

La siembra de muestra debe ser homogénea en cuanto al volumen sembrado y el área de aplicación. La aplicación de la muestra requiere de la evaporación inmediata del solvente, de forma que se evite la dispersión de los fosfolípidos sobre la placa. Durante la siembra se debe evitar que la capa de sílica sea dañada con la punta de la jeringa Hamilton.

Las mezclas de solventes deben ser preparadas inmediatamente antes de usar. Considerar que los solventes tienen diferente densidad, por lo tanto la medición de volúmenes debe hacerse por separado. La mezcla de solventes debe colocarse en la cámara de cromatografía al menos 10 minutos antes de iniciar la corrida cromatográfica; esto permite saturar el ambiente de la cámara con los vapores del solvente, equilibrando la fase gaseosa con la líquida. El sistema de solventes debe ser renovado cada vez que se introduzca una nueva placa a la cámara.

Revelado e identificación

El esparcido de la sustancia de revelado es fundamental. Éste debe hacerse de manera homogénea en toda la placa, para evitar errores de cuantificación cuando se realice la densitometría.

Es recomendable utilizar como estándar muestras de fosfolípidos naturales, por ejemplo fosfatidilcolina de huevo o esfingomielina de cerebro. De esta manera la migración relativa de los estándares se asemeja más a la de las muestras biológicas.

Para el cálculo de la migración relativa se utiliza el punto central de cada mancha.

---

1. Se puede utilizar un secador de cabello casero.

Cuantificación de fósforo de fosfolípidos

Al cuantificar el fósforo de los fosfolípidos separados por TLC es recomendable correr un mínimo de 3 blancos de placa junto con las muestras. Los blancos de placa se obtienen raspando zonas de la placa que no contienen fosfolípidos, como el área por debajo de la zona de siembra y los extremos laterales.

Para poder determinar fósforo en los fosfolípidos separados por TLC se debe utilizar un método de revelado no destructivo, en el cual no se introduzca fosfatos ni se produzcan cambios en la estructura molecular de los lípidos. El método ideal en este sentido es el iodo, ya que se adsorbe temporalmente a los lípidos en la placa.

El material de vidrio debe ser lavado de acuerdo a lo indicado en el capítulo 5.

Curvas de calibración para densitometría

Para la curva de calibración se debe sembrar concentraciones crecientes de cada estándar de fosfolípido, desde 2 hasta 15 nmoles. Además, deben tomarse en cuenta las condiciones para la densitometría, tal como se describe en el capítulo 9.

Procedimiento

Activar las placas de cromatografía colocándolas en una estufa a 110 °C por 30 minutos. Guardarla en una cámara de desecación hasta su uso. Una vez fría la placa, trazar una línea a 12 mm de distancia, paralela a uno de los bordes, con un lápiz blando de punta roma. Marcar luego las líneas o caminos de siembra dejando un espacio de 7 mm en el borde izquierdo, luego trazar 9 líneas de 5 mm separadas por espacios en blanco de 5 mm (ver Fig 8.1).

↓ Preparar 2 cámaras de cromatografía con los siguientes sistemas de solventes: acetona/hexano (1:3) v/v, Cl_3CH/MetOH/ac.acético/H_2O (50:25:8:2) v/v. Dejar estabilizar por 20 min.

↓ Sembrar con jeringa Hamilton los estándares de fosfolípidos (o mezclas de ellos) y las muestras. Aplicar un volumen de 5 μL, equivalente a 8-12 nmoles de fósforo inorgánico, en forma lineal sobre la línea o camino de siembra. Evaporar el solvente con una corriente de aire a medida que se va aplicando la muestra sobre la placa.

↓ Desarrollar la placa en la cámara para TLC que fue estabilizada previamente con acetona/hexano (1:3) v/v, hasta llegar a 5 mm del borde superior. Escurrir la placa sobre papel absorbente en posición vertical (en campana de extracción), secar 15 min con aire caliente.

↓ Desarrollar en una cámara para TLC que fue estabilizada previamente con Cl_3CH/MeOH/ac.acético/agua (50:25:8:2) v/v, hasta llegar a 10 mm del borde superior. Escurrir la placa sobre papel absorbente en posición vertical (en campana de extracción), secar 10 min con aire caliente y luego 10 min en estufa a 100 ºC. Dejar enfriar la placa en una cámara de desecación.

PASO ALTERNATIVO A: En la campana de extracción, rociar la placa con reactivo $CuSO_4/H_3PO_4$. Escurrir. Calentar 15 min en estufa a 160 ºC. Dejar enfriar en una cámara de desecación.

Cuantificar por densitometría de acuerdo a lo descrito en el capítulo 9.

PASO ALTERNATIVO B: En la campana de extracción, colocar la placa boca abajo en un recipiente conteniendo iodo metálico. Esperar unos minutos, hasta que se puedan observar las manchas de los fosfolípidos. Delimitar las manchas de cada fosfolípido marcando el contorno suavemente con un lápiz.

Raspar con un bisturí la sílica correspondiente al área de cada mancha, colocar el material raspado en un tubo de ensayo. Agregar 0.5 mL de Cl_3CH. Tapar el tubo y vorterear. Raspar 3 zonas libres de lípidos como blanco de placa.

Centrifugar a 2000 g por 5 minutos. Retirar el solvente y ponerlo en otro tubo, repetir el paso anterior sobre el precipitado de sílica dos veces más. Evaporar hasta sequedad el solvente con el extracto de fosfolípido utilizando una corriente de nitrógeno a través de una aguja de acero inoxidable.

De acuerdo a lo descrito en el capítulo 5, agregar el reactivo de mineralización, y continuar con el resto del procedimiento para determinar el contenido de fósforo en la muestra.

Experimento 5: Separación de fosfolípidos de eritrocitos humanos en TLC monodimensional

Se trabajó con extractos lipídicos preparados a partir de eritrocitos humanos, en una concentración de 29 mL de extracto por mL de eritrocitos. Los extractos fueron preparados de acuerdo a lo descrito en el capítulo 4.

Los extractos son concentrados bajo corriente de nitrógeno aproximadamente en 10X, de manera de obtener una cantidad de 8-12 nmoles de fósforo inorgánico en 5 μL de extracto concentrado.

A. Muestras

Se trazan las líneas o caminos de siembra de acuerdo a lo especificado en la siguiente figura:

Fig. 1: placa de TLC de Silicagel G sobre vidrio (10 x 10 cm)

Línea de siembra

Se siembran los estándares de fosfolípidos (en una concentración de 2-3 nmoles de fósforo por línea) en las líneas de los extremos, y las muestras en las líneas del medio.

Se dejan estabilizar las dos cámaras por 20 min, con los siguientes sistemas de solventes:

I. acetona/hexano (1:3) v/v

II. Cl_3CH/MeOH/AcH/H_2O (50:25:8:2) v/v

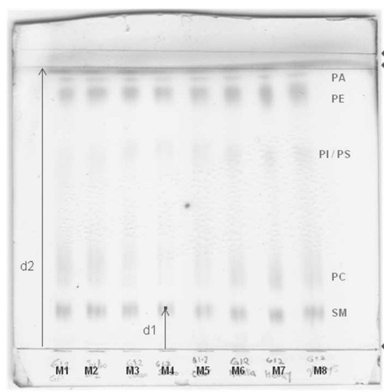
Se desarrolla la cromatografía con el sistema I hasta llegar a 5 mm del borde superior; luego se seca la placa y se desarrolla en el sistema II hasta llegar a 10 mm del borde superior.

La placa es secada nuevamente y rociada con reactivo Cu/H_3PO_4. Se escurre y se calienta por 15 min en una estufa a 160 ºC. Dejándose luego enfriar en una cámara de desecación.

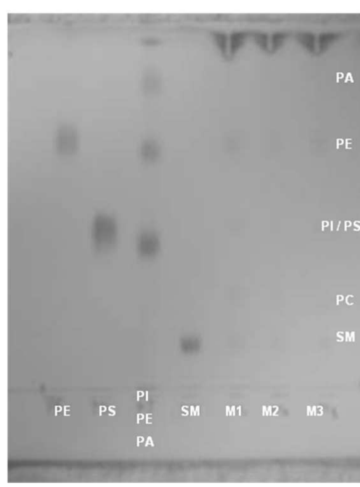
A. Análisis de resultados

Las diferentes especies de lípidos se pueden identificar de acuerdo a su migración relativa en la placa. La migración relativa o factor de retardo (Rf) se calcula de la siguiente manera:

$$Rf = \frac{\text{distancia recorrida por la muestra (d1)}}{\text{distancia recorrida por el solvente (d2)}}$$



Placa de TLC en la que se muestran 8 extractos realizados a una sola muestra de membranas de eritrocito humano.



Placa de TLC en la que se muestran estándares de fosfolípidos y un extracto de membrana de eritrocito humano sembrado por triplicado

Referencias bibliográfícas

1. SKIPSKI, V.P., BARCLAY, M. REICHMAN, E.S., GOOD, J. J. Separation of acidic phospholipids by one-dimensional thin-layer chromatography. 1967; *Biochim. Biophys. Acta.* 137: 80-89.
2. TOUCHSTONE, J.C., LEVIN, S.S., DOBBINS, M.F., MATTHEWS, L., BEERS, P.C., GABBE, S.G. 1983; (3-sn-Phosphatidyl)cholines (Lecithins) in Amniotic Fluid. *Clin. Chem.* 29(11): 1951-1954.
3. GOPPELT, M., RESCH, K. Densitometric quantitation of individual phospholipids from natural sources separated by one-dimensional thin-layer chromatography. 1984; *Anal. Biochem.* 140: 152-156.
4. WELSH, C.J., SCHMEICHEL, K. 1993. Improved method for thin-layer chromatographic resolution and photodensitometric assessment of the major classes of phospholipids. *J. Liq. Chromatogr*. 16(8): 1819-1821.
5. KIRCHNER, J.G. Thin-layer chromatographic quantitative analysis. 1973; *J. Chromatog A.* 82(1): 101-115.

NOTAS

Capítulo 9

Análisis cuantitativo de separaciones

José M. Pellegrino

Introducción al análisis de imágenes

Este análisis es válido para todo tipo de separaciones realizadas sobre soportes planos, como ser cromatogramas, geles, membranas de transferencia, por ejemplo Northern, Southern, Western blots, slot blots, PCR cuantitativa, etc.

Para visualizar los componentes dentro de una placa se utilizan marcadores isotópicos, colorantes o sistemas de detección fluorescentes o luminiscentes. La cuantificación consiste en la medición de la densidad y extensión de las bandas para determinar la cantidad o pureza relativa de las moléculas, la cual se puede llevar a cabo mediante un densitómetro, o bien por medios digitales, esto es, la obtención de una imagen digital de la muestra y posterior análisis de dicha imagen con software apropiado.

El densitómetro de barrido es un fotómetro adaptado para medir placas. Trabajan por reflexión, se utilizan para medir densidades de bandas que se encuentran en un soporte opaco, o por transmisión cuando la imagen se encuentra en soportes transparentes (figura 1). En cualquiera de ellos se puede seleccionar la longitud de onda de trabajo por medio de filtros (fotodensitómetros) o mediante un sistema de prisma o red de difracción (espectrodensitómetros). Algunos modelos permiten seleccionar distintos modos de lectura: reflexión, transmisión, fluorescencia o luminiscencia. Las fuentes de luz pueden ser: lámpara de Hg o Xenón, iluminación láser, diodos, etc.

Poseen un amplio rango dinámico y excelente precisión densitométrica. Son especialmente útiles para muestras opacas (placas de TLC, blots, etc.) conteniendo regiones muy densas. Sin embargo son lentos, un barrido de una placa de TLC de 10 x10 cm toma más de 15 min.

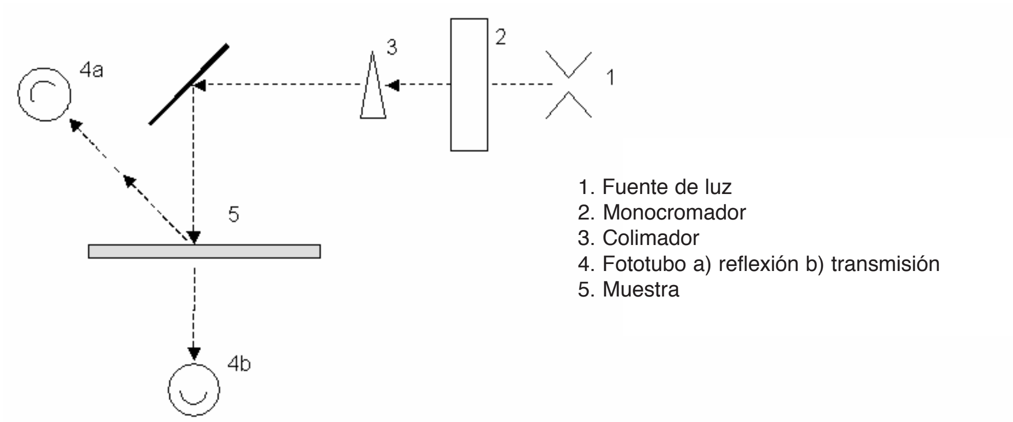


Fig.1. Esquema simple de un densitómetro

En algunos densitómetros es posible, además, elegir el modo de escaneo entre un modo lineal de ventana (variable en x e y) o zig-zag (figura 2). Esta última configuración, aunque un poco más lenta, eliminará los errores causados por la forma irregular de la banda cromatográfica, la cual no puede ser medida en forma reproducible por el método de escaneo lineal. Permite además hacer una corrección automática por las variaciones del 'background'.

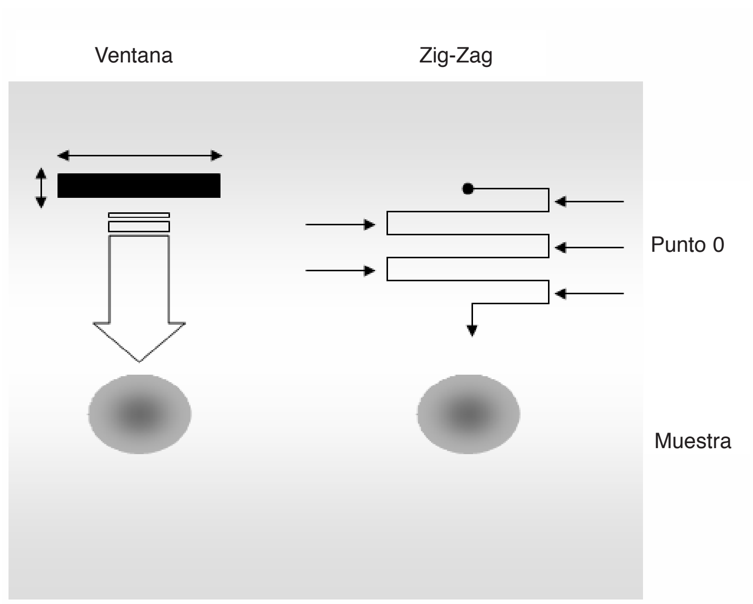


Fig. 2. Métodos de escaneo. Izq.: Escaneo lineal, la ventana por la cual pasa el haz de luz, puede ser variada en ancho y alto (x e y). Derecha: el haz de luz es un punto que se desplaza en zig-zag, siendo modificable el ancho (x) y el salto (Δy). El background (punto 0) es automáticamente corregido sobre ambos lados de la muestra.

Cualquiera sea la configuración elegida del densitómetro para la cuantificación, es fundamental la correcta medida y posicionamiento del haz de luz. En la figura 3 se muestra el error causado por la variación de 1 mm.

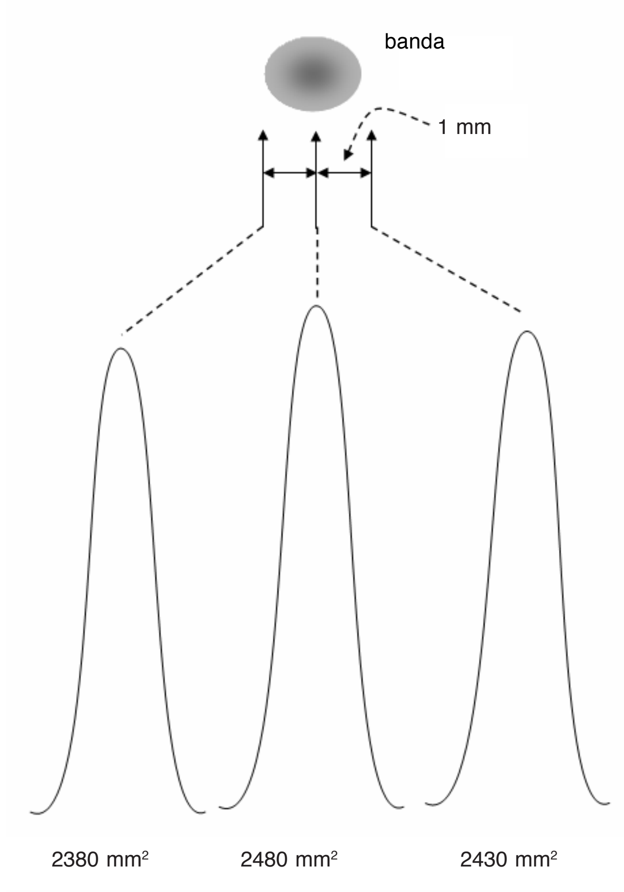


Fig. 3. Influencia del posicionamiento del escáner.

Otra manera de cuantificar una placa de TLC es digitalizando la información, esto es, obtener una imagen digital de la placa y posteriormente analizar, mediante software apropiado, los datos generados a partir de dicha imagen. Este método es el que tiene actualmente mayor difusión dada la mayor accesibilidad de cámaras digitales y computadoras.

Ventajas del análisis de imágenes

Las separaciones pueden ser evaluadas «a ojo», usando herramientas simples de medida. Una regla y un densitómetro básico pueden proveer datos apropiados para determinados propósitos. Sin embargo, un análisis más detallado requiere instrumentación más sofisticada. Por ejemplo, si se necesitan saber los pesos moleculares y las purezas proporcionales o abundancias de

varios compuestos distribuidos a través de una calle, el análisis de imágenes ofrece varias ventajas:

a) es por lejos la manera más rápida de obtener datos cuantitativos
b) las muestras digitalizadas proveen un archivo permanente que pueden reemplazar la fotodocumentación
c) previo a la medición, pueden ser aplicadas correcciones por artefactos («background», deformaciones, etc.)
d) proveen simultáneamente vistas de la muestra junto con los gráficos y datos que se generan durante el análisis
e) son flexibles: permiten analizar los datos generados cambiando condiciones (por ej. control de background, modo de integración, etc.) Además permiten analizar eficientemente diferentes tipos de muestras (TLC, geles, membranas (isotópicas o no isotópicas).

El punto e) requiere alguna profundización. La tecnología de separaciones (TLC, electroforesis, etc.) está evolucionando constantemente a medida que aparecen nuevos métodos y se mejoran los establecidos. Muchos avances técnicos implican muestras que requieren iluminación, detección o análisis especiales, por lo tanto el analizador de imágenes debe permitir analizar los distintos tipos de muestras independientemente del tipo de iluminación, detección o análisis empleado.

Digitalización de imágenes

Las imágenes fotográficas no se brindan por sí mismas para el análisis por computadora dado que estas últimas trabajan con información numérica y no con información gráfica. Para procesar en una computadora una imagen, primero debe convertirse en un formato numérico. Este proceso es conocido como *digitalización de imágenes.*

El proceso de digitalización divide una imagen en una grilla, o arreglo, de muy pequeñas regiones llamadas «píxeles» (picture elements) (figura 4). En la computadora la imagen es representada por esta grilla digital o «bitmap». Cada píxel en el bitmap es identificado por su posición en la grilla (x,y) (fila, columna). Por convención, los píxeles son referenciados desde la esquina superior izquierda, la cual es considerada como posición 0,0 (fila 0, columna 0).

Cuando una imagen es digitalizada, se muestrea cada píxel en la imagen, y su brillo es cuantificado por un número entero. Dicho valor es almacenado en el correspondiente píxel del bitmap.

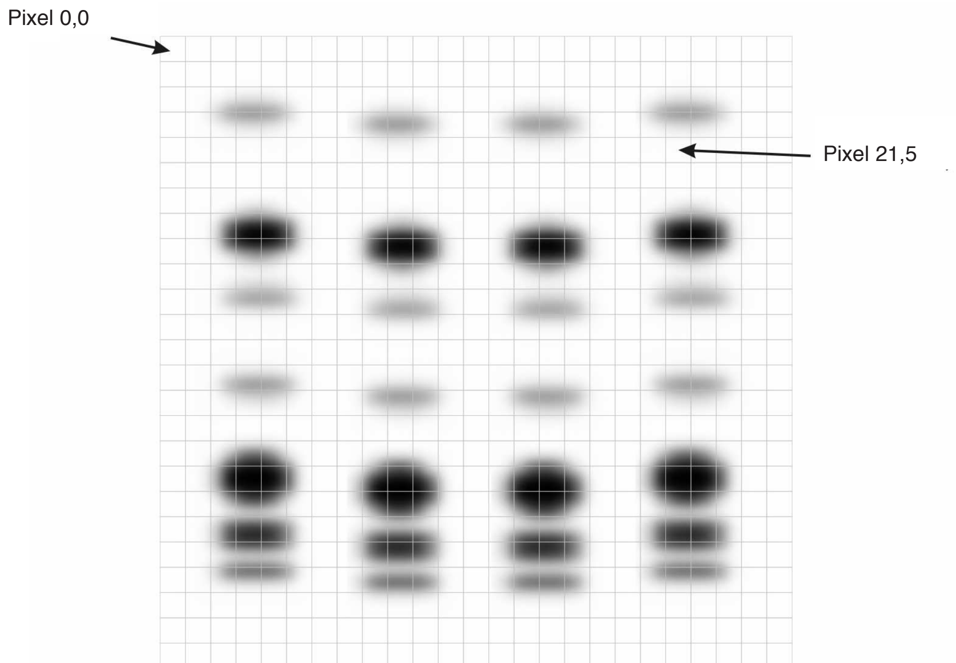


Fig. 4. Bitmap de píxeles. En este ejemplo la imagen fue digitalizada con una resolución de 25x25.

El ancho y alto de los píxeles en el bitmap son elegidos y fijados por el usuario, constituyendo la ***resolución espacial***. Obviamente a mayor resolución, mayor será la medida del archivo resultante. En el ejemplo: 25x25= 625 bytes, si se aumenta la resolución al doble, 50x50= 2500 bytes, el «peso» del archivo se cuadruplica.

Profundidad de la muestra y resolución del color

La unidad más pequeña de información que utiliza una computadora es el **bit** (Binary Digit) que puede tener dos estados: 1 ó 0 (encendido o apagado). Con la combinación de ocho bits (ejemplo 00110010) se forma un byte que puede asumir 256 valores distintos (2^8), ya que son las combinaciones posibles con 8 bits del sistema binario. Dependiendo de la cantidad de bytes, formarán kilobytes, megabytes, gigabytes, etc.

La profundidad de color de una imagen se refiere al número de colores diferentes que puede contener cada uno de los puntos, o píxeles, que conforman un archivo gráfico. En otras palabras, la profundidad de color depende de la cantidad de información que puede almacenar un píxel (esto es, del número de bits).

Cuanto mayor sea la profundidad de bits en una imagen (esto es, más bits de información por píxel), más colores habrá disponibles y más exacta será la representación del color en la imagen digital.

Profundidad de color (nº datos o bits por píxel)	Tonos (colores) posibles	Comentario
1 (bit por píxel)	**2** tonos (2^{1})	• Arte Lineal (B&N) • (Modo Mapa de Bits)
4 (bits por píxel)	**16** tonos (2^{4})	• Modo Escala de Grises
8 (bits por píxel)	**256** tonos (2^{8})	• Modo **Escala de Grises** - (8x1= 8) • Modo **Color Indexado** • la cantidad estándar de colores que admiten muchas aplicaciones multimedia.
16 (bits por píxel)	**65.536** tonos (2^{16})	• *High Color*
24 (bits por píxel)	**16.777.216** tonos (2^{24})	• ***True Color*** *(relacionado con que el ojo humano puede distinguir un máximo de 16 millones de colores)* • (Modo RGB –8 bits por canal–) (8x3=24) • Modo Lab –8 bots por canal– (8x3=24)
32 (bits por píxel)	**4.294.967.296** tonos (2^{32})	• (Modo CMYK)



0 (Negro) 255 (Blanco)

Cantidad de tonos representados por profundidades de bits comunes:

Si todos los valores para rojo, verde y azul son puestos en cero, resulta en negro, mientras que 255, 255, 255 produce blanco. Si las tres proporciones de color son iguales, se define un color gris.

Los sistemas de imágenes como instrumentos analíticos

La tarea más simple que un sistema de imágenes debe efectuar es mostrar una imagen. El sistema de imágenes es usado para archivar la imagen en formato digital, controlar los instrumentos de adquisición (tales como densitómetros de barrido) e impresoras, y mejorar la visibilidad de las distintas características de las muestras usando técnicas simples de imágenes (por ej. pseudocolor). Este

tipo de sistema es usualmente denominado «sistema de documentación de geles».

Más allá de simplemente digitalizar, exhibir, e imprimir un espécimen, son necesarias dos clases de medidas:

• *Medida espacial:* se utiliza para determinar la posición y magnitud (por ejemplo área) de una característica. El sistema de imágenes debe poder calibrar a una o más escalas no lineales de la distancia, tales como peso molecular.

• *Densitometría:* se utiliza para medir las cantidades relativas dentro de bandas. La densitometría sin calibrar es raramente adecuada, porque los valores son afectados por falta de linealidad en la respuesta del sistema. La calibración a la densidad óptica (OD) permite que se hagan asunciones (por ejemplo la ley de Lambert/Beer) con respecto a la relación entre la densidad (o intensidad de la fluorescencia, luminiscencia) y concentración. La calibración en unidades de la concentración, usando estándares externos, proporciona las medidas más exactas de la concentración.

Un sistema de análisis debe permitir que una calibración siga siendo válida, aun cuando la muestra presente distorsiones. Con las muestras no deformadas, las medidas espaciales son relativamente sencillas, y realizando una calibración para los pesos moleculares, son posibles medidas exactas. Sin embargo, puesto que muchas muestras exhiben distorsiones (tales como sonrisa o comba), se necesitan funciones para la corrección de la distorsión espacial. Los problemas típicos son la necesidad de mantener buen contraste con las bandas estrechas, la necesidad de amplio rango dinámico y la necesidad de alta sensibilidad en fluorescencia y luminiscencia. Para que una medida sea válida, es crítico que el dispositivo de adquisición sea apropiado a las características de la muestra.

Dispositivos para adquisición de imágenes

Son aparatos que convierten un patrón de energía irradiada en una imagen digital que se almacena en una memoria de acceso aleatorio (RAM).

Prácticamente cualquier cámara o escáner es adecuado para muestras bien iluminadas, y que no excedan el rango de 1 unidad de densidad óptica (D). Sin embargo, no todas las muestras tienen esas características ideales. Las muestras fluorescentes/luminiscentes tienden a tener regiones muy brillantes y muy tenues, lo cual hace que su rango pueda exceder más de cuatro órdenes de magnitud. Similarmente, muchas muestras opacas o autorradiografías, contienen regiones muy oscuras que exceden 1D. El instrumento de adquisición debe ser seleccionado acorde a las características de la muestra.

Por ejemplo, en el caso de autorradiografías densas, o con fluorescencia o lumi-niscencia, si se deben discriminar pequeñas diferencias de densidad en muestras que posean un amplio rango dinámico (>1D), es necesario adquisición de alta precisión (12, 16 bits).

Densitómetro de tira

Este instrumento escanea una calle, mostrando los valores de posición y densidad en un registrador o computadora, lo cual resulta en un gráfico de variaciones de densidad a lo largo de la calle. Son sensibles (pueden detectar pequeñas diferencias de densidad) y tienen un amplio rango dinámico (pueden escanear muestras densas). Sin embargo, son lentos, leen sólo una calle por vez, y generan un gráfico, no una imagen de la muestra. Dado que el gráfico no se superpone sobre la muestra, puede ser difícil correlacionar el gráfico con la muestra.

Densitómetros de barrido

Mueven un haz de luz colimada o un haz láser sobre la muestra. Un detector mide la cantidad de luz transmitida o reflejada y ese dato es tomado por una computadora que ensambla cada punto discreto en una imagen completa.

Cámaras digitales estándar

Son aptas para un sistema de imágenes de bajo costo. Permiten ajustar la iluminación, zoom, etc. mientras se visualiza la imagen digital, dicha capacidad de digitalizar imágenes tan rápidamente se refiere a menudo como «imágenes en tiempo real» y esa es su mayor conveniencia. La mayor limitación es su estrecho rango de respuesta, no pueden discriminar con exactitud diferencias superiores a 1D aunque pueden adquirir imágenes de muestras fluorescentes moderadamente brillantes

Cámaras Integradoras

Actualmente las cámaras de calidad son de tecnología CCD (charge-coupled devices) (dispositivo de carga acoplada). Acumulan la señal por un período de tiempo sobre un número de marcos (frames). Se pueden integrar dos o más marcos de video, antes de que una imagen salga de la cámara. Pueden integrar durante 100 milisegundos, 1000 milisegundos, o cualquier otro intervalo. Para evitar el ruido procedente del propio instrumento que se origina en ausencia de luz por emisiones térmicas internas, el chip que integra la señal se enfría (chilled, >0º C) o se refrigera (cooled, <0º C). Las cámaras refrigeradas tienen mayor sensibilidad que las cámaras enfriadas. Para aprovechar la alta sensibilidad, ofrecen también mayor precisión (12-16 bits). Una cámara refrigerada, de alta precisión es excelente para luminiscencia, pero probablemente innecesaria para la mayoría de las muestras fluorescentes, salvo para las extremadamente débiles.

Aunque las imágenes monocromo han desaparecido casi totalmente en

aplicaciones de uso masivo, ellas aún representan la mayoría en procesamiento digital de imágenes debido primariamente al costo de la cámara y la carga del procesamiento de datos (una cámara monocromo produce más de 10 millones de píxeles por segundo).

Lectores de placas (Phosphoimagers)

La película es un registrador ineficaz de la emisión de partículas. Por ejemplo, menos del 5% de las partículas beta emitidas por una muestra marcada con ^{32}P realmente interactúan con la emulsión de una película estándar de radiografía para formar una imagen. Por lo tanto, pueden ser requeridas exposiciones largas.

Las placas fotoestimulables de fósforo son ampliamente utilizadas como alternativa para registrar y cuantificar imágenes autorradiográficas. Las ventajas de estas placas son un rango dinámico lineal que cubre cinco órdenes de magnitud, y una exposición mucho más rápida que la película.

Escáneres de fluorescencia, multipropósito, etc.

Como alternativa al marcado isotópico, hay disponibles una variedad cada vez mayor de escáneres de fluorescencia y luminiscencia.

Escáneres

Resolución: se mide en dpi (dots per inch) (puntos por pulgada), por ejemplo si un escáner tiene una resolución de 600 dpi, esto significa nada más que su arreglo de escaneo (scan array) puede dividir una pulgada del original en 600 elementos. Para hacer esto, el escáner tiene un número correspondiente de receptores sensibles a la luz, cada uno de los cuales mide el brillo de una delgada sección del original.

Resolución óptica e interpolada: la resolución óptica refiere al número real de fotocélulas por pulgada. En contraste, la interpolada (o calculada) es el resultado de una aplicación de software por medio de la cual se generan píxeles adicionales, calculados hallando el promedio de píxeles e insertándolos entre los píxeles realmente escaneados. Por lo tanto debe ser tenido en cuenta que la interpolación no conduce a la adición de detalle verdadero.

Observaciones Prácticas

Adquisición de la imagen: *siempre* debe ser en tonos de gris (8 bits o mejor) ya que lo que se analiza es la diferencia de intensidades, además los archivos generados son más chicos.

Archivo de la imagen: debe hacerse *siempre* en el formato crudo (RAW) del instrumento de adquisición o bien como TIFF. En estos formatos no se comprime la información como sucede en JPG el cual es más apto para Internet,

presentaciones, etc., pero *NO* para análisis de imágenes, ya que el algoritmo de compresión hace que se pierda información.

Distancia entre calles: conviene que estén lo más separadas posibles (algunos autores recomiendan una separación de 3 x la longitud de la siembra), ya que el instrumento de adquisición trabaja con 256 o más tonos de gris, mientras que el ojo humano detecta sólo 16 tonos. Por lo tanto los límites de la banda son mucho más amplios que lo que el ojo detecta (figura 5).

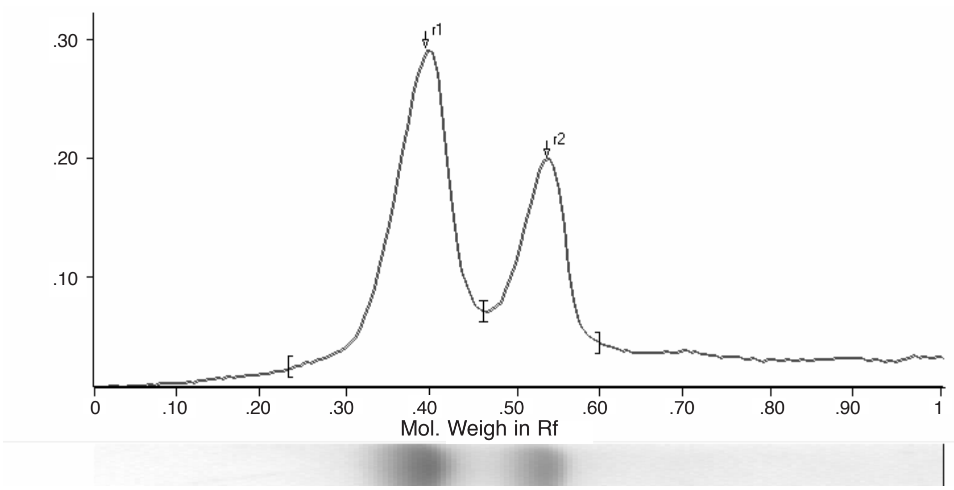


Fig. 5. Detección de un dispositivo de adquisición.

Cuestiones fundamentales acerca de escanear

La regla **GIGO** también se aplica al escaneo. **GIGO** = Garbage In, Garbage Out.

¿Cuanto mayor la resolución, mejor?

Falso, hay una resolución correcta para cada aplicación. Una baja resolución no es apropiada para imprimir un póster, mientras que una alta resolución no solamente sería superflua para mostrar una imagen en Internet por ejemplo, sino que sería aun problemática. La imagen requeriría largos tiempos de transmisión y no ajustaría. Generalmente es verdadero que a mayor resolución del escáner, pueden ser leídos mayores detalles del original. Si embargo, hay restricciones naturales. Por ejemplo, tiene poco sentido escanear un original diminuto, como una foto de pasaporte, a una gran resolución como 5000 dpi. La cantidad de información que el escáner es capaz de generar, simplemente no existe en el original. Por lo tanto, escáneres con una resolución de 600 ó 1200 dpi son casi siempre adecuados para el uso diario.

¿Se puede usar un escáner para aumentar la nitidez de una foto borrosa?

Falso, aunque el escaneo y el software de edición de imágenes ofrecen

varios filtros de «sharpening», ellos sirven primariamente para reducir el leve emborronamiento causado por el escaneo. La lección a ser aprendida es que las opciones de optimización ofrecidas no son sustitutas de una buena fotografía. No se pueden crear detalles de la imagen que no están en el original.

¿Si se desea imprimir una foto en una impresora de 720 dpi, también se debe escanear a 720 dpi?

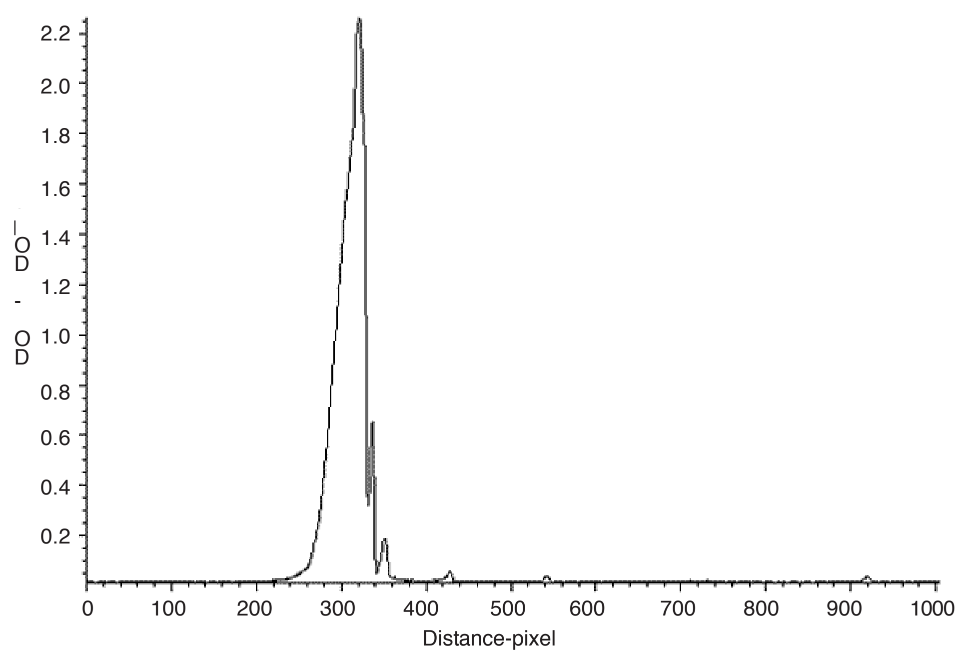
Falso, porque en la impresora de 720 dpi, los puntos se logran por interpolación: no son reales.

¿Escanee primero y optimice más tarde?

Falso, porque los pasos de optimización tomados durante el proceso de escaneo, tales como corrección del contraste, «sharpening», medida, etc. usualmente producen resultados de mejor calidad dado que ellos refieren a una mayor cantidad de datos.

Iluminación de campo claro

Las imágenes típicas incluyen placas cromatográficas teñidas, películas autorradiográficas, geles de proteínas teñidas, etc. Para todos estos propósitos, las cámaras estándar son convenientes, rápidas y útiles para muestras con densidades de hasta 1.2-1.4D. Los picos o los puntos más densos son leídos con mayor error. Los densitómetros son lentos, pero exactos a través de un rango dinámico más amplio (>3 unidades OD, figura 6).



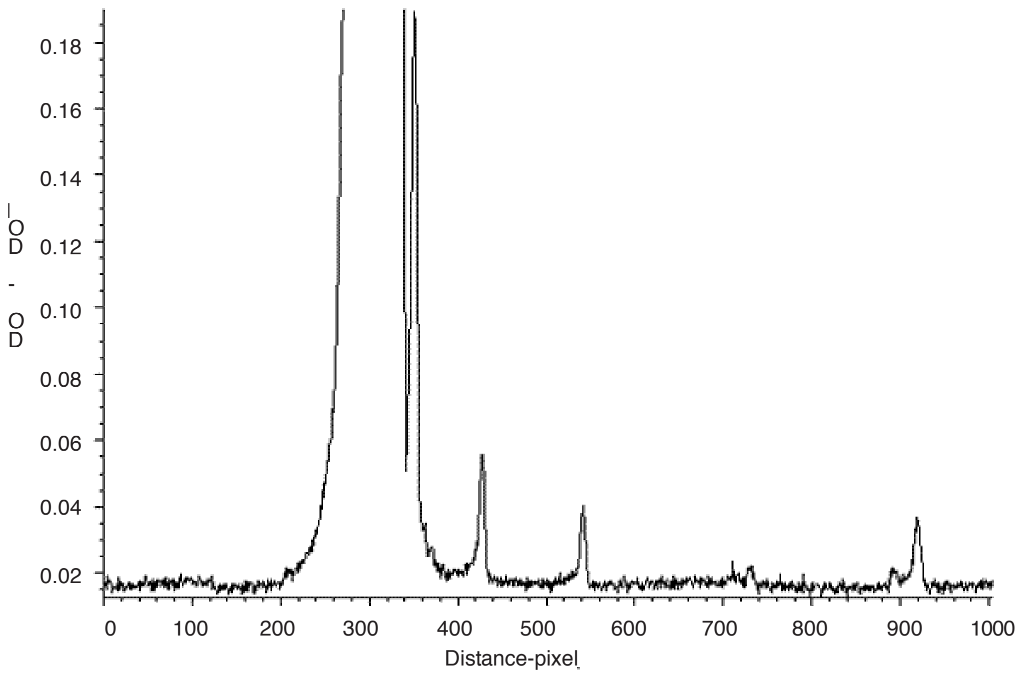


Fig. 6: placa explorada en un densitómetro láser. En la figura superior, se observa la amplia gama de densidades presentes en esta muestra (hasta cerca de 2.3 D). Debajo, enfocamos dentro del rango menor a 0.2 D, para mostrar la información en las porciones más claras de la placa. Dado que el densitómetro tiene rango dinámico amplio y precisión de 12 bits (4096 niveles de grises), las bandas densas y muy claras pueden ser cuantificadas simultáneamente.
Escáneres estándares de documentos (por ejemplo Hewlett-Packard ScanJet) son adecuados para análisis cualitativos y para la lectura de la posición. Pueden leer las muestras sobre un rango dinámico mayor que las cámaras estándar, pero tienen precisión limitada en las partes más densas del espécimen. Su escala de 8 bits (256 niveles de gris) es inadecuada para la densitometría exacta a través de un rango dinámico amplio. Siempre se deben calibrar con escalas de densidad como la mostrada en la figura 7.

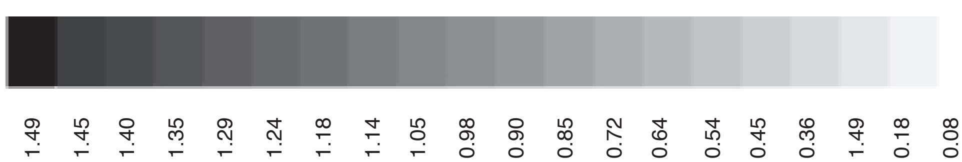


Fig. 7: Escala de densidad Kodak para calibración indicando las densidades ópticas

Ventajas de un sistema integrado de archivo y análisis: un sistema digital de archivos se debe seleccionar con atención a las necesidades futuras. Si se requieren los análisis cuantitativos, ahora o en el futuro, se debe considerar instalar un solo sistema que pueda manejar archivar/documentación y análisis de imágenes digitales. Sólo se necesita aprender y validar un sistema.

Características fundamentales convenientes en un sistema de archivo y análisis

- Sistema de aviso de sub y sobrexposición durante la captura de las imágenes
- Soporte de imágenes de 12 y 16 bits y de escáner
- Identificación automática de calles y bandas en una imagen
- Calibración (espacial y de densidad), las calibraciones de densidad deben incluir funciones de interpolación y extrapolación
- Calibraciones de estándares de distancia lineales (milímetros) y no lineales (peso molecular, pH)
- Corrección de artefactos: como ser variaciones del fondo (background), que afectan densitometría, y las deformaciones (stretching or smiling) que afectan las medidas de Rf, peso molecular, etc.
- Algunas muestras, como ser geles, placas de TLC de vidrio, etc. son frágiles, y se deterioran con la manipulación y el tiempo. En cambio, la imagen digital se guarda como archivo en un disco de la computadora, y sirve como registro permanente. La imagen digital se puede recuperar de la computadora y exhibir en cualquier momento,
- Base de Datos de Experimentos e Imágenes
- Manejo de diferentes formatos de imagen. Debe poder leer y escribir: TIFF, HPP, BMP, CUT, EPS, JPG,...
- Exportación de resultados (Tablas, gráficos, datos) hacia MS Excel y otros programas
- Soporte de Internet y FTP
- Generación de Informes con el formato elegido por el usuario

Algunas marcas de software disponibles

ImageJ	http://rsb.info.nih.gov/ij/
IPLab	http://www.scanalytics.com/product/iplab/
GelPro Analyzer	http://www.mediacy.com/index.aspx?page=GelPro

Referencias bibliográficas

RUSS, J. C. Roadmap Guide to Image Analysis, *disponible en http://www.drjohnruss.com/downloads/course.pdf*

RUSS, J. C. *The Image Processing Handbook 3rd ed CRC Press, 1998*

STROKA, J. Spangenberg, B, Anklam, E. New Approaches In TLC-Densitometry. *J Liq Chromatogr Relat Technol* 2002; 25: 1497 – 1513.

PATTON W, F. Detection technologies in proteome analysis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002; 771: 3-31.

CROMEY D. W. Digital Imaging: Ethics 2007*, disponible en http://swehsc.pharmacy.arizona.edu/exppath/micro/digimage_ethics.html*

RUSS, J. C. Seeing the Scientific Image *Proc. Royal Micr. Soc. 2004, 39(2); 39(3); 39(4) disponible en http://*www.drjohnruss.com/downloads/seeing.pdf

Experimento 6: Cuantificación de fosfolípidos de membrana de eritrocito por técnicas densitométricas

Se digitalizaron placas de separaciones de fosfolípidos obtenidas de extractos de membrana de eritrocito de rata. Las separaciones se realizaron de acuerdo a las técnicas expuestas en el capítulo 8, experimento 5. También se desarrollaron cromatografías de estándares de fosfolípidos con el fin de realizar curvas de calibración, en el ejemplo se muestra una placa en la que se desarrollaron dos muestras de extracto y un estándar de SM, se agrega además la imagen digitalizada de la placa.

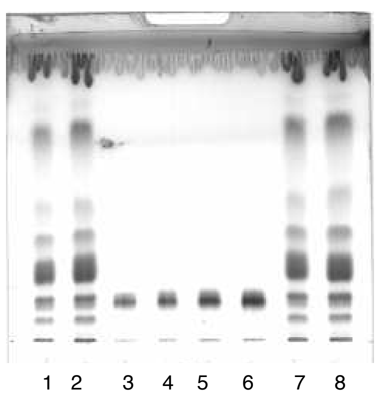
Las imágenes se obtuvieron con un escáner Epson Action Scanner II. Las condiciones de adquisición fueron:

Black & White Photo, 8 bits, 300 dpi.

Exposure: 2; Gamma: 122; Highlight: 196; Shadow: 2; Sharpness: 0

Las bandas fueron analizadas con el programa de análisis de geles GelPro Analyzer 3.0 con las siguientes condiciones (foto de la derecha):

Lane width: 120 píxeles; Min. band height %: 0.75; Slant line; Baseline flat



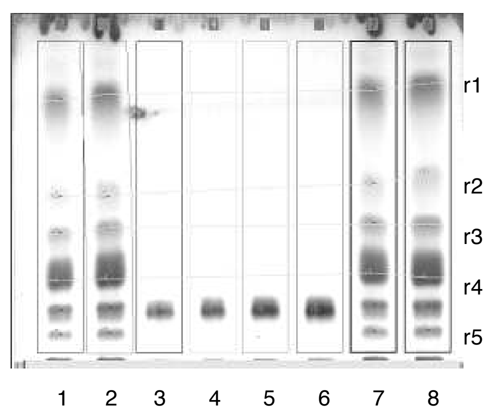


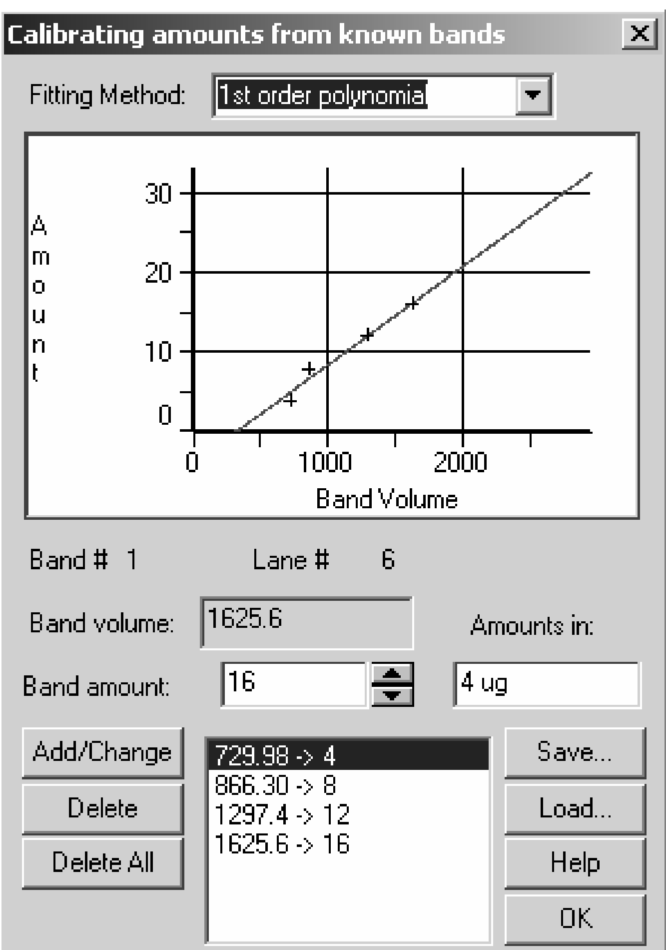
Fig. 8: digitalización de placas de TLC.

Las muestras sembradas fueron:
Calles 1 y 2: muestra nº 4: 2 y 3 μL.
Calles 7 y 8: muestra nº 5: 2 y 3 μL.
Calle 3: estándar de esfingomielina (SM) 4 μg.
Calle 4: estándar de esfingomielina (SM) 8 μg.
Calle 5: estándar de esfingomielina (SM) 12 μg.
Calle 6: estándar de esfingomielina (SM) 16 μg

Las densitometrías obtenidas fueron:

Lanes:	Lane 1	Lane 2	Lane 3	Lane 4	Lane 5	Lane 6	Lane 7	Lane 8
Rows	(IOD)	(IOD)	(IOD)	(IOD)	(IOD)	(IOD)	(IOD)	(IOD)
r1	966.2	1527.9					1519.7	2010.9
r2	119.4	247.2					223.6	330.4
r3	250.2	455.0					421.2	625.2
r4	1517.1	2429.7					2098.9	2687.1
r5	514.1	798.7	730.0	866.3	1297.4	1625.6	702.0	923.5
r6	169.4	313.0					276.3	372.1

La curva de calibración obtenida con el programa utilizado es la siguiente:



e obtuvo la siguiente ecuación:

Interpolando en la curva los datos de IOD se pueden obtener las cantidades de SM para cada muestra, las que posteriormente deberían referirse a los volúmenes de extractos sembrados.

Ejemplo para la muestra nº 4, calle 1 se obtienen 2,37 μg de SM, para la calle 2: 5.90 μg de SM, etc.

Como alternativa, utilizando las curvas de calibración realizadas para cada FL de la muestra, se calculará la masa de cada fracción separada e identificada, para luego calcular la distribución porcentual de FL en cada muestra.

NOTAS

Capítulo 10

Separación de Fosfolípidos por cromatografía en capa fina (TLC) bidimensional

Joaquín V. Rodríguez

Fundamentos

La TLC bidimensional es particularmente útil para determinar qué tipo de lípidos polares se encuentran en un extracto. Por ejemplo para resolver mezclas complejas de FL y sus lisofosfolípidos correspondientes. En general la placa es desarrollada en una dimensión con un sistema de solventes que contiene Cl_3CH, MetOH e NH_4OH, luego es secada y desarrollada nuevamente a 90 ° con el segundo sistema de solventes que contiene Cl_3CH, MetOH y AcH[1]. El desarrollo con el primer sistema que contiene amonio causa que los PL acídicos se cromatografíen como sales de amonio, en el segundo sistema se separan mejor la PS y el PI. Se debe obviar en el primer sistema el uso de AcH porque puede producirse descomposición de algunos lípidos durante el secado.

Los componentes separados pueden ser eluidos y recuperados cuantitativamente del adsorbente para su cuantificación o recromatografía. La TLC bidimensional puede usarse para verificar la pureza de FL separados por TLC monodimensional[2]. La TLC bidimensional no es apropiada para la cuantificación densitométrica y generalmente es menos reproducible que el sistema monodimensional. Se pueden obtener fracciones de manera semipreparativa si se aplican mayores cantidades de muestra en placas de 20 x 20 cm. Para la identificación por Rf de las fracciones separadas es necesario correr cada estándar en una placa en las dimensiones tal como se explica más adelante. Las tinciones específicas se aplican de la misma manera que para la TLC monodimensional.

TLC en silicagel modificada

Se han descripto otras técnicas como la RPTLC o TLC en fase reversa, en este caso la silicagel de las cromatoplacas se hace apolar impregnándolas con hidrocarburos de cadena larga o silanizándolas con dimetildiclorosilano[3].

Las separaciones cromatográficas se basan entonces en interacciones apolares migrando los LP más rápidamente que los LNP. Esta técnica es útil para la separación de sustancias como los FAME, TG y CO-E[3].

NO_3Ag: Otra técnica interesante es la cromatografía de impregnación argéntica que consiste en impregnar la cromatoplaca mediante atomización con una solución de NO_3Ag al 0.2 % en acetonitrilo. El mecanismo de separación se basa en que los iones Ag forman complejos con los dobles enlaces de los ac. grasos componentes de las distintas fracciones lipídicas. La separación dependerá de la cantidad de dobles enlaces, si éstos son cis o trans, de su localización en la cadena alifática y también del largo de la cadena. Esta técnica se puede aplicar a la separación de FAME, PL, TG, CO-E y galactolípidos (3). Las cromatografías deben ser desarrolladas en la oscuridad, los componentes pueden ser visualizados con el reactivo 4 (Cap.7).

Ac. Bórico: si se impregnan por inmersión placas de TLC con acido bórico 1.2% en EtOH absoluto:H_2O (1:1)(v/v), es posible separar FL y liso FL, específicamente PS y PI[2]. También se pueden separar acilgliceroles. El ácido bórico forma complejos reversibles con los hidroxilos libres de las moléculas de lípidos y aumenta la movilidad de las mismas sobre el adsorbente. Las placas impregnadas deben ser secadas y activadas para luego desarrollarlas en Cl_3CH:MetOH: H_2O:NH_4OH (120:75:6:2).

EDTA-ácido oxálico: para mejorar la separación de FL aniónicos/PA/PI y PS, las placas de silicagel pueden ser impregnadas en ácido oxálico o EDTA , estas sustancias secuestran el Ca^{++} presente en la sílica que pueda asociarse con los FL y retardar su migración. Las placas se sumergen 90 seg. en 0.054 M ácido oxálico ajustado a pH 7.20 con KOH. Esta técnica permite separar fosfatidilinositoles y otros FL[4].

Referencias bibliográficas

1. ROUSER, G., FLEISCHER, S. and YAMAMOTO, A. Two-dimensional tin-layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids* 1970; 5:494-496.
2. FINE, J.B. and SPRETCHER, H. Unidimensional thin-layer chromatography of phospholipids on boric acid-impregnated plates. *J.Lipid.Res.* 1982; 23:660-663.
3. HAMILTON, R.J. and HAMILTON, S. Phospholipids in: Lipid Analysis. A practical approach. Oxford, IRL Press;1992:84-85.
4. MEDH, J.D. and WEIGEL, P. Separation of polyphosphatidylinositols and other phospholipids by two.step one-dimensional thin-layer chromatography. *J.Lipid.Res.* 1989; 30:761-764.

Experimento 7: Separación de fosfolípidos de un extracto de eritrocitos de rata/humano en TLC bidimensional

Objetivos:

a) determinar la composición de fosfolípidos de un extracto lipídico obtenido de eritrocitos de rata/humano utilizando TLC bidimensional.

b) identificar cada componente por comparación de Rf con estándares y por tinciones específicas

c) cuantificar la composición de fosfolípidos por elución y posterior espectrofotometría.

Drogas y reactivos

CL_3CH, MeOH, Acetona, AcH, NH_4OH.
Standards de PC, PS, PI, PE, SM, LPC, LPE.
Reactivo Cu/H_3PO_4 (ver Experimento 4), I_2.

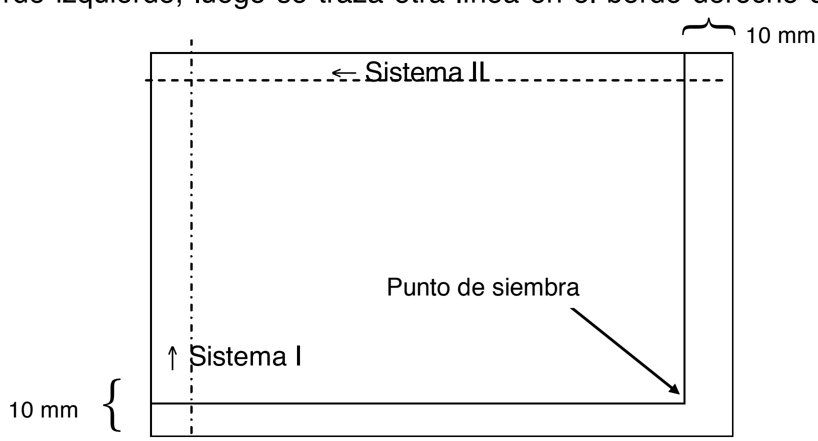
Materiales

Placas de Silicagel G de 10 x 10 cm, Cubas de cromatografía, estufa, secador de cabello, desecador de vidrio.

Técnica

- activar las placas 30 minutos a 110 ºC, luego guardar en desecador
- preparar dos cubas con los siguientes sistemas de solventes:
  - I- $CL_3CH:MeOH:NH_4OH$ (13:5:1, v/v/v), homogeneizar.
  - II- $CL_3CH:Acetona:MeOH:AcH:H_2O$ (6:8:2:2:1, v/v/v/v), homogeneizar

    dejar estabilizar al menos 20 minutos cada cuba con su tapa
- sembrado de la muestra: a una altura de 10 mm del borde inferior de la placa, marcar con lápiz suavemente una línea. Se deja un espacio de 10 mm en el borde izquierdo, luego se traza otra línea en el borde derecho dejando un



espacio de 10 mm. La muestra se sembrará en la intersección de ambas en el extremo inferior derecho.

- sembrar en (x) un volumen del extracto lipídico con jeringa Hamilton
- correr la placa en sistema de solventes I hasta 10 mm del borde superior (línea punteada)
- escurrir la placa sobre papel absorbente en posición vertical (en campana de extracción) y luego secar 10 minutos con aire caliente
- girar la placa 90 ° en el sentido horario, ahora el borde inferior está dado por la raya trazada en segunda instancia
- correr la placa en sistema de solventes II hasta 10 mm del borde superior (línea de puntos y rayas)
- escurrir la placa sobre papel absorbente en posición vertical (en campana de extracción) y luego secar 10 minutos con secador de cabello.

Revelado: el revelado puede hacerse de manera no destructiva utilizando I_2, marcando las posiciones de los distintos FL con un lápiz, para luego rasparlos y eluirlos de la sílica o para realizar las tinciones específicas.

Como alternativa si se quiere documentar el cromatograma, puede realizarse la tinción con el reactivo Cu^{++}/H_3PO_4.

Raspado y elución de FL de la Silicagel: una vez identificados los distintos fosfolípidos, se procede a rasparlos de la capa de silicagel con una espátula de acero inoxidable y trasvasar el polvo obtenido cuidadosamente a un tubo de extracción. Este paso se realiza con la ayuda de un pincel de pelo de camello y un pequeño embudo. En otro tubo, también debe rasparse un trozo de sílica de un extremo de la placa para realizar un blanco de sílica.

Se realizan tres extracciones x 2 mL c/u con CL_3CH:MeOH (1:1, v/v), centrifugando entre cada extracción y reuniendo los extractos en un solo tubo. Luego se concentra a sequedad bajo N_2 y se reconstituye a un volumen fijo (0.20 mL) con CL_3CH:MeOH (1:1, v/v). Para determinar la concentración de FL como Pi, se utilizan distintos volúmenes de este extracto (10, 20 y 50 μL).

Identificación de Fosfolípidos por tinciones específicas

Lípidos que contienen Colina: PC, LPC y SM pueden ser identificados con el reactivo de Dragendorf:

I- IK 40 % en agua

II- Carbonato de Bismuto 5 g + 40 mL de agua

III- Agregar lentamente y agitando el reactivo II sobre el I, luego filtrar. Almacenar en frasco color caramelo en heladera.

Técnica: rociar la placa y secar con aire caliente

Revelado: los lípidos que contienen colina aparecen como manchas de color rojo-naranja

Lípidos que contienen grupos amino: **PE, PS, LPE y LPE**

Reactivo: Ninhidrina 0.2 % en EtOH

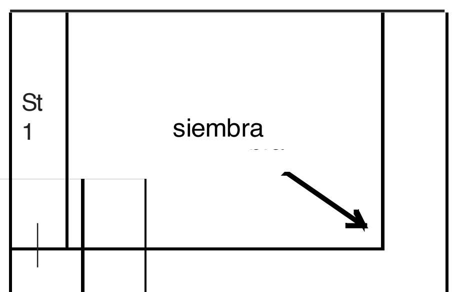
Técnica: rociar la placa y calentar a 100 ºC en plancha de calentamiento.

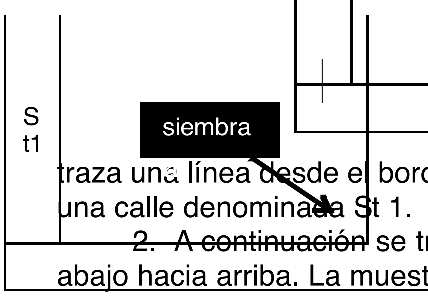
Revelado: PE, PS, LPE y LPS aparecen como manchas de color rojo-violeta.
Reactivo: Fluorescamina 0.05 % en acetona.
Técnica: rociar la placa
Revelado: los lípidos que contienen grupos amino dan fluorescencia blanca bajo la luz UV.

Lípidos que contienen grupos fosfato
Reactivo: Disolver 0.1 g $FeCl_3.6H_2O$ y 7 g de ac. Sulfosalicílico en 25 mL de agua, diluir a 100 mL con EtOH del 96%.
Técnica: Rociar la placa
Revelado: Los grupos fosfato son detectados como manchas blancas fluorescentes sobre un fondo púrpura.

Identificación de fosfolípidos por Rf por comparación con estándares
Preparar 1 placa de TLC (10 x 10 cm) para cada estándar cuyo Rf queremos determinar, de la siguiente manera:

1. A una altura de 10 mm del borde inferior de la placa, marcar con lápiz suavemente una línea de lado a lado, luego a 10 mm de borde izquierdo se





traza una línea desde el borde inferior al superior y de esta manera tendremos una calle denominada St 1.

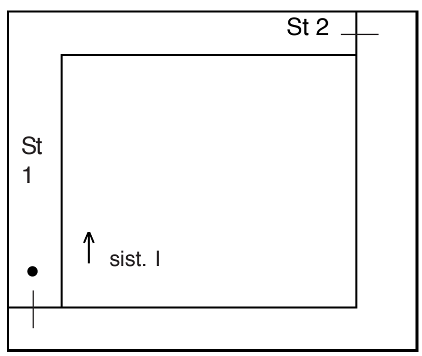
2. A continuación se traza otra línea a 10 mm del borde derecho desde abajo hacia arriba. La muestra se sembrará en la intersección de ambas en el extremo inferior derecho (x).

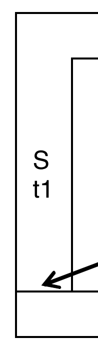


3. Por último a 10 mm del borde superior trazamos una línea de lado a lado, aquí tendremos otra calle que llamaremos St 2.

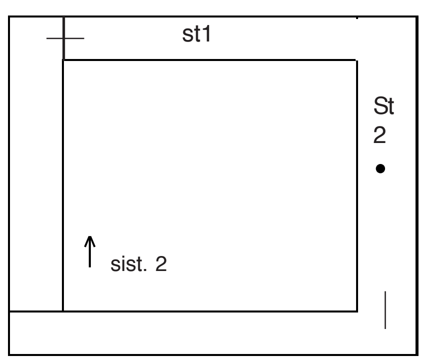
St
1

Supongamos que queremos determinar los Rf correspondientes a PC, para ello sembramos una alícuota del estándar en la calle St1, otra en x y una tercera en la calle correspondiente a St2. Luego la placa se corre en el sistema de solventes I hasta 10 mm del borde superior, se deja escurrir y se seca con aire caliente, luego se gira 90 ° en sentido horario y se corre con el sistema de solventes II hasta 10 mm del borde superior. Luego se escurre, se seca y se revela.

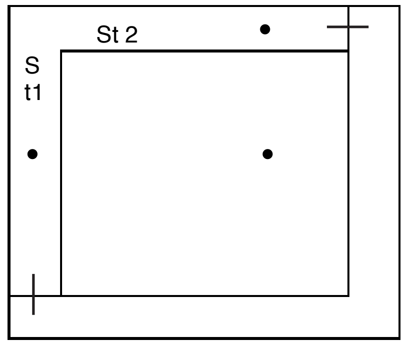




Después de girar 90 °



Finalmente obtendríamos la siguiente imagen



La posición de la mancha correspondiente al estándar utilizado está dado por dos Rf, el primero (Rf1) correspondiente al sistema I y el segundo (Rf2) al sistema II, la intersección de ambas posiciones nos da la ubicación de la sustancia en el cromatograma bidimensional. De esta manera se determinan los Rf correspondientes a todos los estándares necesarios para identificar los FL de los extractos estudiados.

Resultados esperados: En la figura 1 se presenta la separación de FL de eritrocitos de rata desarrollada con el procedimiento explicado en el experimento 7.

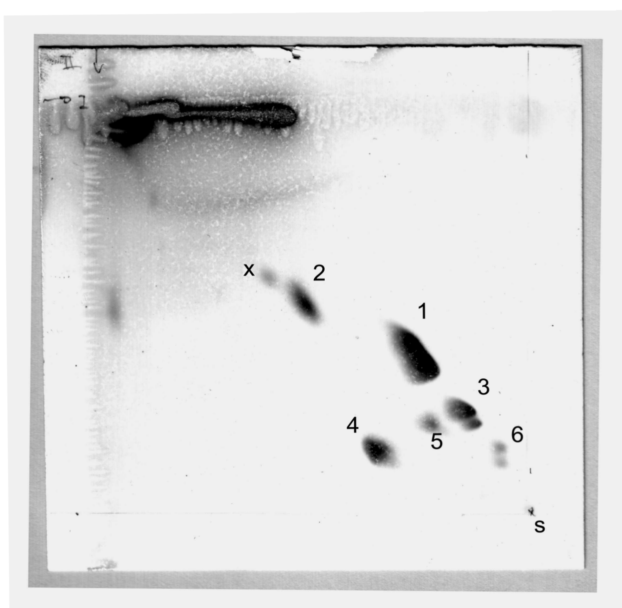


Fig.1: se muestra una TLC bidimensional de FL de eritrocitos de rata. Tinción Cobre-fosfórico. Placa de silicagel G 60. Desarrollada con solventes I y II (Exp. 7). Identificación de FL:
1- PC, 2- PE, 3- SM, 4-PI/PS, 5- LPE, 6- LPC, x- desconocido, s- punto de siembra.

En las figuras 2 a 4 se muestran los resultados correspondientes al desarrollo bidimensional de estándares de FL en las mismas condiciones que el extracto de FL presentado en la figura 1.

En la figura 2 se muestra la TLC bidimensional de un estándar de LPE (4 mg/mL) se sembraron 2 μL.

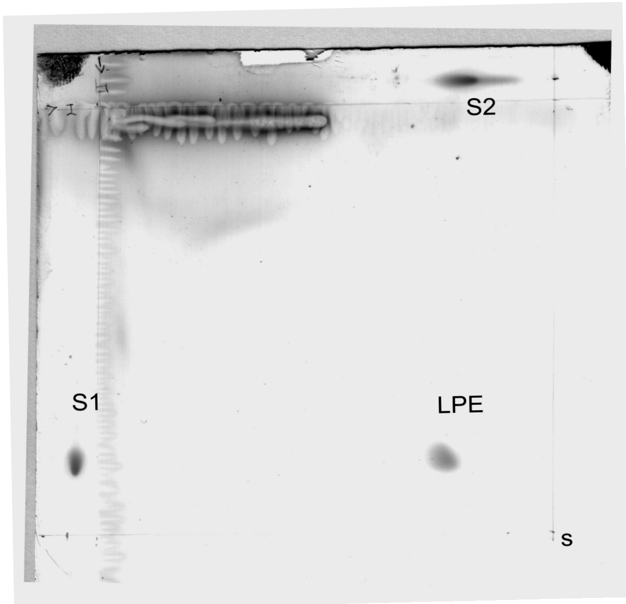


Fig.2: Tinción Cobre-fosfórico. Placa de silicagel G 60. Desarrollada con solventes I y II (Exp. 7). Identificación de FL: LPE- estándar de lisofosfatidiletanolamina, s- punto de siembra, S1- desarrollo del estándar con sistema de solventes 1, S2 - desarrollo del estándar con sistema de solventes 2.

En la fig. 3 se muestra la TLC bidimensional de un estándar de SM (4 mg/mL) se sembraron 2 μL.

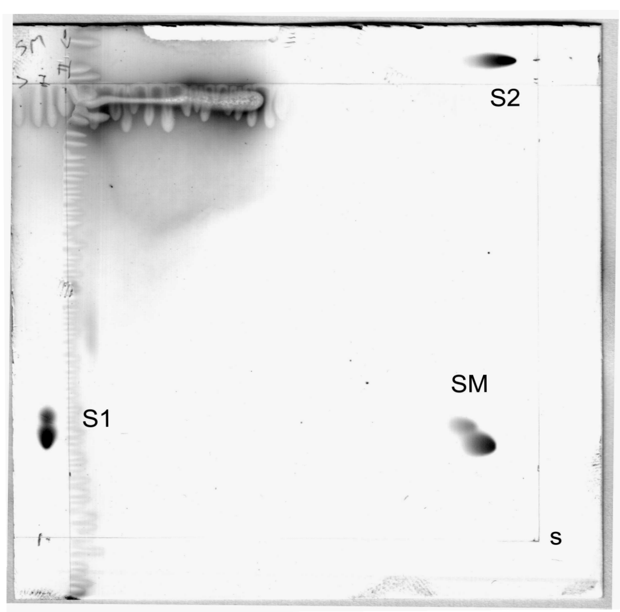


Fig. 3: Tinción Cobre-fosfórico. Placa de silicagel G 60. Desarrollada con solventes I y II (Exp. 7).
Identificación de FL:
SM- estándar de esfingomielina, s- punto de siembra, S1- desarrollo del estándar con sistema de solventes 1, S2 - desarrollo del estándar con sistema de solventes 2.

En la figura 4 se muestra la TLC bidimensional de un estándar de LPC (4 mg/mL) se sembraron 2 μL.

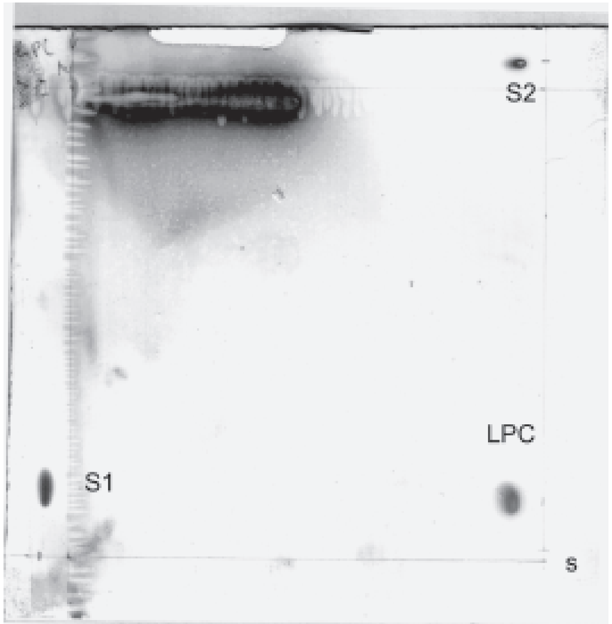


Fig. 4: Tinción Cobre-fosfórico. Placa de silicagel G 60. Desarrollada con solventes I y II (Exp. 7).
Identificación de FL:
LPC- estándar de lisofosfatidilcolina, s- punto de siembra, S1- desarrollo del estándar con sistema de solventes 1, S2 - desarrollo del estándar con sistema de solventes 2.

En la tabla 1 se muestran los Rf obtenidos para algunos estándares de FL en cada sistema de solventes y la correspondiente identificación en la muestra desarrollada en la figura 1.

Tabla 1: Identificación de fosfolípidos por Rf desarrollado en TLC bidimensional

Sustancia	Rf1	Rf2	Identificación
estándar LPE	0.17	0.19	--
estándar SM	0.23	0.14	--
estándar LPC	0.14	0.05	--
muestra			
mancha 5	0.20	0.21	LPE
mancha 3	0.25	0.14	SM
mancha 6	0.15	0.05	LPC

Rf1: Rf obtenido al desarrollar con sistema de solventes I en la dimensión 1, Rf2: Rf obtenido al desarrollar con sistema de solventes II en la dimensión 2 (giro de 90 °).

NOTAS

Capítulo 11

Análisis de ácidos grasos por cromatografía gaseosa

Mónica Hourcade y Nelson G. Stürtz

Introducción

Los ácidos grasos (AG) son moléculas orgánicas constituidas por una cadena alquílica con un grupo carboxílico terminal. En los organismos se encuentran formando parte de la estructura básica de los triglicéridos (TG), fosfolípidos (PL), ésteres de colesterol (EC), glucolípidos (GL), ceras, en forma libre, etc.

En la actualidad, la determinación del contenido de los diferentes AG tiene variadas aplicaciones que van desde la industria de los alimentos y bebidas, donde es importante la determinación de los ácidos grasos totales, así como la relación de *cis/trans,* industria de los biocombustibles, investigación, diagnóstico, etc. También han sido utilizados para determinar, a partir de los fosfolípidos de membranas celulares de microorganismos, la biomasa microbiana y proveen información sobre la estructura taxonómica, diversidad funcional y estatus nutricional de comunidades microbianas.

La forma más común de determinar la composición de AG en una muestra biológica comprende cuatro etapas principales que son: extracción lipídica, fraccionamiento o aislamiento de componentes lipídicos, derivatización a compuestos volátiles, y análisis por cromatografía gaseosa (GC).

Cuando debemos analizar la composición de AG en diferentes lípidos, lo primero que debemos realizar es la separación de los diferentes lípidos y posteriormente derivatizarlos para su análisis a través del uso de la cromatografía gaseosa (GC). Esta técnica se basa en la determinación de los componentes de una mezcla a través de la separación de los componentes volatilizados que constituyen dicha mezcla a través del pasaje por una columna y su posterior detección utilizando algún tipo de detector.

Derivatización de ácidos grasos

Para poder analizar los AG por GC conviene transformarlos en compuestos más volátiles. Muchos ácidos grasos de cadena corta son volátiles a temperatura ambiente, pero aquellos con más de 12 átomos de carbono necesitan

una gran temperatura para poder volatilizarse. La transformación a ésteres metílicos (FAME) o etílicos (FAEE) suelen ser las derivatizaciones más comunes ya que permiten el análisis mejorando la forma de los picos, favoreciendo así una mejor separación[1].

Desde el *punto de vista químico,* los ácidos grasos son capaces de formar enlaces éster con los grupos alcohol de otras moléculas, y es precisamente esta característica la que se utiliza para poder obtener su derivatización.

La formación de FAME se realiza en presencia de un agente catalizador mezclado o disuelto en etanol. La catálisis puede ser ácida (HCl al 5-10% en MetOH anh. , H_2SO_4 al 1-2 % en MetOH anh. o BF_3 entre el 15-20% en MetOH anh.) o alcalina (NaOCH$_3$, KOH o NaOH en MetOH anh., tetrametil hidróxido amonio, diazometano pero no es aconsejable ya que es explosivo). Un inconveniente de las reacciones ácido catalizadas es que no proceden a temperatura ambiente y requieren calor, es por ello que se deben dejar algún tiempo en una fuente de calor para que ocurra la reacción. En el caso del uso del metóxido de sodio, esta reacción cursa a temperatura ambiente, pero tiene el riesgo de descomponer los AG poliinsaturados. Tampoco esterifica a N-acil lípidos (esfingolípidos y glicoesfingolípidos) ni a los AG libres.

Las reacciones que tienen lugar en el proceso de derivatización de AG son:

• *Reacciones de transesterificación* (catalizadas por ácido o una base)

$$\textbf{R´-CO-OR´´ + R-OH} \xrightarrow{H^+ \text{ o } ^-OCH_3} \textbf{R´-CO-OR + R´´-OH} \quad [1]$$

• *Reacciones de esterificación* (catalizadas por ácido)

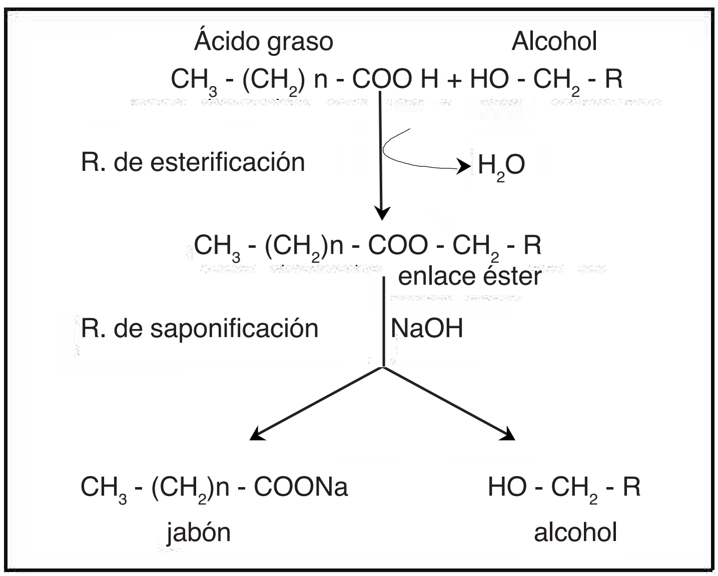
$$\textbf{R´-CO-OH + R-OH} \xrightarrow{H^+} \textbf{R´-CO-OR} + \mathbf{H_2O} \quad [2]$$

La presencia de agua interfiere en ambas reacciones, ya que una vez formados los ésteres, puede tener lugar una hidrólisis que rompe los ésteres formados. Es por ello que una de las condiciones principales de los reactivos utilizados para las transesterificaciones y saponificaciones es que se encuentren libres de agua. Los solventes deben ser destilados o rectificados y herméticamente cerrados. Por ello estos reactivos deben ser cuidadosamente almacenados evitando que se humedezcan.

Así como la hidrólisis ácida es reversible (reacción 2), la hidrólisis alcalina es irreversible y se denomina saponificación. La elección de los reactivos de metilación dependerá de la composición lipídica de la muestra a analizar, así como de otros parámetros como la temperatura y del tiempo de reacción.

Un requisito importante en la metilación de AG es que la reacción debe completarse en un 100%, no quedando AG sin reaccionar. Además no debe

existir cambios en la composición de dichos AG en la muestra. Un problema que puede llegar a presentarse es la formación de artefactos, o subproductos de reacción, que pueden llegar a detectarse como FAME. Es por ello que la elección de los reactivos de esterificación debe ser muy cuidadosa de acuerdo a la característica de la muestra. Otro problema que puede existir es la conversión incompleta de los AG en sus ésteres metílicos. Al disminuir la temperatura de ebullición, por medio de la formación del FAME, se debe ser muy cuidadoso de realizar todos los procedimientos, luego de las etapas de calor, en condiciones refrigeradas para evitar la pérdida de los AG de cadena corta. Además los FAME de cadena corta son solubles en agua. Si se debe determinar AG de cadena corta, se pueden evitar todos estos inconvenientes formando sus ésteres isopropilo utilizando H_2SO_4 y alcohol isopropílico anhidro.



Esterificaciones catalizadas por ácidos

El uso de trifluoruro de boro/metanol es actualmente una de las alternativas más utilizadas en la etapa de derivatización y fue puesto de manifiesto gracias a un estudio detallado[2] en el que se establecieron las temperaturas y reacción en función de los diferentes tipos de lípidos. Así, a una temperatura constante de 100 °C BF_3/MetOH entre el 20-30%, de los AG libres sólo necesitan dos min para convertirse en ésteres metílicos, mientras las esfingomielinas necesitan 90 min para su completa conversión. El mayor problema de este reactivo es que al envejecer produce artefactos y debe además mantenerse en condiciones anhidras. Otro problema con su uso es que si hay plasmalógenos en la muestra, ellos reaccionan dando aldehídos que producen interferencias en las determinaciones.

Reactivos: BF_3/MetOH al 14% (mantener refrigerado eliminando el aire con N_2, descartar después de tres meses o cuando aparezcan precipitados).

Procedimiento: Una alícuota de extracto lipídico (aproximadamente 10 mg) secada bajo corriente de N_2 se coloca en un tubo de vidrio con tapa a rosca y contratapa de teflón. Se agrega 1mL BF_3/MetOH. Si se analizan triglicéridos o ésteres de colesterol, o son abundantes en el extracto, los lípidos secos se deben disolver en 0,75 mL de una mezcla Cl_3CH/MetOH (50:50 v/v) y se agregan 0,25 mL de BF_3/MetOH. De ser posible, se debe eliminar el aire de la capa superior con N_2 y luego cerrar el vial. Calentar en baño María de acuerdo a lo indicado en la siguiente tabla:

Lípido	**Tiempo (min)**
Acidos grasos	5
Triglicéridos	45
Ésteres de colesterol	45
Monoacil gliceroles	15
Diacil gliceroles	15
Glicero fosfolípidos	15
Glicero Glicolípidos	15
Esfingomielina	90
Glico esfingo lípidos	90

Enfriar y agregar 1mL de agua y 2 mL de hexano. Vorterear durante 1 min, centrifugar a baja velocidad y recolectar la fase superior. Transferir la fase orgánica y agregar Na_2SO_4 anh., vorterear, centrifugar y retirar la capa orgánica. Evaporar y disolver el residuo en 50 o 100 μL de hexano. Inyectar en el GC.

Otra metodología consiste en la reacción de los AG con HCl 10% en solución metanólica[3].

Reactivos: HCl al 10% en MetHO. Agregar 20 de Cloruro de acetilo gota a gota a 100 de metOH agitando en un agitador magnético. Benceno, tolueno o hexano.

Procedimiento: Colocar en un tubo de vidrio con tapa a rosca y contratapa de teflón una muestra que contenga aproximadamente 10 mg de lípidos, agregar el estándar interno, agregar 3 mL de HCl/MetOH. Vorterear y llevar a baño María durante 2 hs. Retirar y enfriar sobre un baño de hielo. Agregar 1 mL de hexano, agregar cuidadosamente 10 mg K_2CO_3 y vorterear durante 1 min. Centrifugar 5 min a aproximadamente 500 x G para separar los capas de solvente. Transferir la capa superior, agregar Na_2SO_4 anh., vorterear, centrifugar y retirar la capa orgánica. Evaporar el solvente y resuspender en 50-100 μL de hexano y analizar por GC.

Esterificaciones catalizadas por bases

Los ésteres grasos formados con una base (alcoholato) forman un intermediario aniónico que es transformado en la presencia de un gran exceso del alcohol en un nuevo éster. Los AG libres no se encuentran sujetos a ataque nucleofílico por los alcoholes o bases, por lo tanto no se esterifican en estas condiciones.

Las derivatizaciones en la presencia de catalizadores básicos tienen la ventaja de la velocidad y que no necesitan calor. Así, este tipo de catalizadores son los que se recomiendan con AG de cadena corta o AG muy lábiles (poliinsaturados, anillos de ciclopropano, insaturaciones conjugadas, etc.).

El agente transesterificante más útil es el metóxido de sodio o potasio 1 o 2 M en MetOH anh. Estas soluciones son estables por varios meses a 4 °C hasta que se forme un precipitado blanco. Los triglicéridos son transesterificados rápidamente (2-5 min) a T° ambiente. Un mejoramiento de la técnica p ara analizar FAME provenientes de triglicéridos y fosfolípidos es descripta por Ichihara y col.[4].

Reactivos: hexano, KOH o NaOH 2 M en metanol.

Procedimiento: Disolver aproximadamente 10 mg de lípidos en 2 mL de hexano seguido por la adición de 0,2 mL de solución 2M de KOH o NaOH en metanol. Tapar fuertemente el tubo eliminando el aire residual con N_2 y vorterear durante 2 min a T° ambiente. Centrifugar suavemente. Recoger la fase hexano y llevar a sequedad con N_2. Redisolver el residuo en 50 o 100 μL de hexano. Analizar por GC.

Nota: Los esteroles y ceras no reaccionan bajo estas condiciones.

Una alternativa para la formación de metil ésteres catalizada por base utiliza ter-butóxido de potasio y 2-metoxietano[5].

Reactivos: Terbutóxido de K 1 M en THF, 2 metoxietanol, hexano, Na_2SO_4 anh.

Procedimiento: En un tubo de vidrio con tapa a rosca y contratapa de teflón, se agregan 100 μL de una solución de terbutóxido de potasio en THF a 200 μL de metoxietanol anhidro. Tapar y homogenizar. A esta mezcla se le agregan aproximadamente 10 mg de lípidos en 1mL de hexano. Colocar a 40 °C durante 15 min. Enfriar luego en baño de hielo. Agregar 1 mL de agua y 2 mL de hexano. Luego vorterear durante 10 seg a temperatura ambiente. Centrifugar suave-mente. Recoger la fase hexano sobre sulfato de sodio anhidro. Filtrar y llevar a sequedad bajo corriente de nitrógeno. Redisolver inmediatamente el residuo en 50 o 100 μL de hexano. La solución ya se encuentra lista para ser inyectada en el GC.

También se puede adoptar otro método para muestras lábiles. Un método que evita la formación de productos de oxidación fue descripto por Piretti y col. [6]. Este método es utilizado en el análisis de lípidos altamente insaturados. Además si están presentes AG hidroperóxidos, ellos pueden reducirse en los correspondientes hidroxi componentes.

Reactivos: NaOH 2M, $NaBH_4$, Na_2SO_4 anh., acetato de etilo, metanol, hexano.

Procedimiento: Se secan aproximadament 2 mg de lípidos neutros o 100 mg de lípidos polares en un tubo de vidrio. Agregar 1 mL del reactivo, fabricado al disolver inmediatamente antes de usar, 400 mg de $NaBH_4$ en 10 mL de la mezcla metanol/NaOH 2M (19:1 v/v). La mezcla se agita durante 20 min a T° ambiente. Luego agregar 2 mL de agua, y eliminar el metanol bajo N_2. Los FAME son recuperados de la fase acuosa al extraerlos 3 veces con 1mL de acetato de etilo. La fase orgánica es luego lavada 3 veces con 1mL de agua y secada al agregarle el Na_2SO_4. Después se vorterea y centrifuga, el acetato de etilo es evaporado y el residuo disuelto en 50-100 μL de hexano para el análisis por GC.

Transesterificación

Es el grupo de reacciones en las cuales un éster reacciona con otro compuesto para formar un éster diferente. El otro compuesto puede ser un ácido, un alcohol, u otro éster. Estas reacciones son también conocidas como acidolisis, alcoholisis, e intercambio de éster, respectivamente.

Las reacciones son conducidas en fase líquida, usualmente en presencia de un catalizador. Con catalizadores, la temperatura común de reacción es de 100 °C; sin un cat alizador, se debe utilizar aproximadamente 250 °C. Una excepción es el intercambio dirigido de ésteres en grasas, lo cual es realizado a temperaturas de alrededor de 50 °C. La temperatura inferior deja que los glicéridos saturados cristalicen.

En el caso de tener muestras complejas de diferentes tipos de lípidos, lo primero que se realiza es una saponificación con NaHO en MetOH anh. en baño María. Luego se le adiciona BF3/MetOH y se lo lleva nuevamente a baño María. Aquí se realiza la extracción de los FAME con hexano. Se debe prestar especial atención a que se realice una extracción completa de los FAME, de manera tal de no realizar una determinación en defecto. Este punto es conveniente validarlo previamente con el uso de patrones y diferentes volúmenes de hexano en la extracción.

Equilibrio de Reacción

Las constantes de equilibrio, y así la conversión de equilibrio, pueden ser predichas a partir de los datos para la formación de los éster reactantes y los productos. Considerar la reacción de alcoholisis [3].

RCOOR' + R''OH → RCOOR'' + R'OH **[3]**

Las reacciones que conducen a la formación de los dos ésteres a partir del ácido y el alcohol apropiados se muestran en [4] y [5]

RCOOH' + R'OH → RCOOR' + H_2O **[4]**

RCOOH + R''OH → RCOOR'' + H_2O **[5]**

Las respectivas constantes de equilibrio de concentración son presentadas a continuación:

Cinética de Reacción y Catalisis

Las velocidades de las reacciones de transesterificación responden a las condiciones de reacción y la estructura molecular de las sustancias de manera similar a las reacciones de esterificación en general. Los catalizadores útiles para la esterificación también son buenos para transesterificación. En presencia de un catalizador alcalino, las velocidades de alcohólisis son muy altas, siendo más rápido aun que la saponificación. Los alcohoxidos sódicos son particularmente útiles para la alcoholisis y el intercambio de éster y permiten obtener velocidades prácticas de reacción a temperaturas inferiores que las de esterificación. Por su naturaleza básica, estos catalizadores obviamente serían inaptos para otras esterificaciones.

Otras reacciones para derivatizar AG

Sililación

Si bien la esterificación con F_3B/MetHO ha sido el método de derivatización más empleado, se han descripto también otras metodologías que corrigen los diferentes defectos tales como la inestabilidad del reactivo, destrucción de epoxis, ácidos grasos cíclicos, grupos hidroxi y no derivatización de materiales no saponificables. La trimetilsilis derivatización es un método eficiente pero tiene una serie de inconvenientes como ser la inestabilidad térmica y la hidrólisis parcial de los derivados. Para superar estos defectos, fue desarrollado el método de derivatización con ter-butildimetilsilano (tBDMSi) por Woo y col.[7]. Se demostró que estos derivados tienen alta estabilidad térmica e hidrolítica y aumentan la sensibilidad y selectividad de los análisis.

Procedimiento: A aproximadamente 10 mg de AG disueltos en 200 μL de hexano, se le agrega en un tubo de vidrio con tapa a rosca de teflón una cantidad conocida del estándar interno y 75 μL de N-metil(ter-butildimetil-silil) trifuoroacetamide y 5 μL de trimetilamina. Luego se lo cierra fuertemente y se lo mantiene a 75 °C durante 30 min. Luego se inyect a directamente en el GC.

La separación se realiza utilizando una columna capilar HP-1 (50 mt x 0.2 mm ID). Para todos los AG el área de los picos de este tipo de derivados es mayor en un orden de 1,5 a 6,7 con respecto a los FAME. En contraste, la estabilidad se reduce a 3 días.

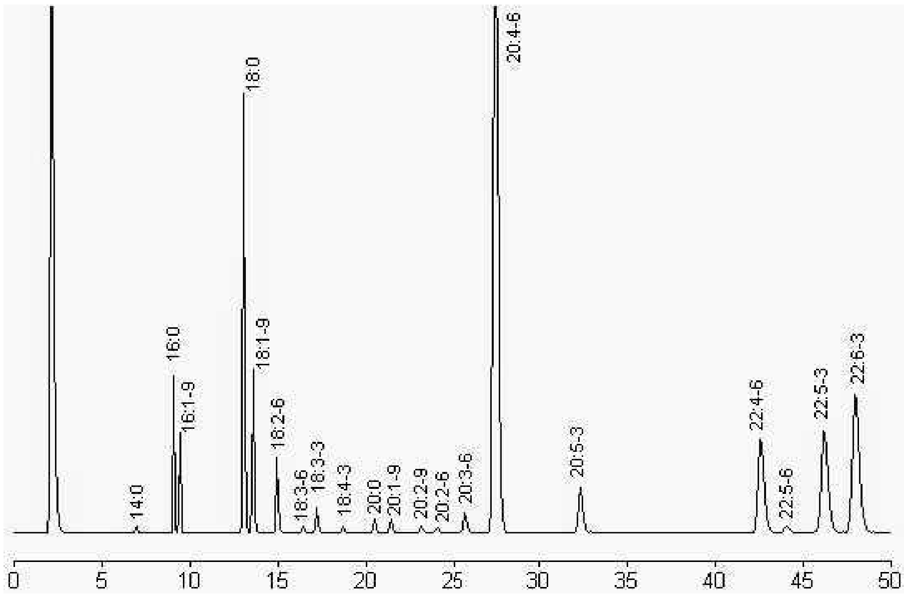
Análisis de AG por cromatografía gaseosa

La técnica utilizada para la determinación cualitativa y cuantitativa de los ácidos grasos en forma de sus ésteres metílicos es la cromatografía gaseosa. El uso de columnas capilares polares permite separar un gran número de FAME en función de su temperatura de ebullición y polaridad[8]. Así, por lo general los AG de cadena corta y los de menor número de instauraciones eluyen antes que los de cadena larga y mayor número de dobles enlaces respectivamente. El

principio en el que se basa la cromatografía es la distribución de una muestra entre dos fases, una fase estacionaria líquida (que se encuentra esparcida sobre un soporte sólido inerte con un gran área de superficie) y una fase gaseosa que pasa a través de la fase estacionaria. Se utiliza como gas portador o carrier helio, nitrógeno o hidrógeno. En el caso de utilizarse este último, se deben ajustar muy bien las condiciones de trabajo y verificar que no existan pérdidas debido a su alta inflamabilidad. La ventaja del uso del hidrógeno es que acorta el tiempo de corrida, mejora la base de los picos y extiende el rango de velocidad lineal que puede ser usado en respuesta a la complejidad de la muestra sin disminuir seriamente la resolución de la columna[9].

La fase estacionaria más utilizada es de polietilenglicol (Carbowax) u otra compuesta por bis-cianopropilsiloxano. Cuanto mayor es la proporción de estos compuestos en la fase estacionaria, mayor grado de polaridad tiene la columna. La composición de este tipo de fase permite la separación de diversos isómeros geométricos *cis/trans* e isómeros posicionales. La fase estacionaria produce el retardo de los componentes que conforman la muestra en función de su coeficiente de distribución, produciéndose de esta manera la separación de los diferentes FAME[10].

Las condiciones analíticas deben adaptarse desde los valores publicados para obtener resultados reproducibles y precisos. El programa de temperatura es el principal parámetro a modificarse de acuerdo a la naturaleza de la columna y la complejidad de la muestra de AG a separar. La identificación de un pico puede hacerse en función de su tiempo de retención (t_r). En la práctica, es conveniente trabajar no con el tiempo de retención, que es una variable dependiente del flujo del carrier y de la temperatura, sino con el t_r relativo a un estándar interno (por ejemplo el ácido esteárico, que se encuentra presente en todas las muestras o un estándar interno agregado en la muestra como ser C15:0 o C17:0). El logaritmo del t_r relativo y el número de átomos de carbono están relacionados de manera lineal y puede ser de alguna utilidad para identificar AG desconocidos. La gráfica de estos parámetros con series homólogas de AG saturados, monoenos, dienos, trienos, etc. da una serie de líneas paralelas. Alternativamente, la identificación de los FAME es posible usando el concepto de la longitud de cadena equivalente (ECL), al expresar su posición de elución relativa a aquella de un FAME saturado de cadena corta conocida. Debemos remarcar que la identificación de AG de acuerdo a ECL se realiza de manera más exacta cuando se trabaja en condiciones isotérmicas. Los detalles del cálculo de ECL y las tablas correspondientes para un gran número de FAME son presentadas en reportes especializados[11].



Cromatograma correspondiente al perfil de AG de fosfolípidos de hígado de rata. Los AG son representados por su número de átomos de carbono: series de n° de dobles enlaces (n-x). Columna Carbowax (Alltech), 30 mts x 0,25 mm ID, 0,25 μm diámetro de partícula. Programa de temperatura: 100 °C durante 2 min., 195 °C durante 33 min. y 220 °C al final. Ramp as de 40 °C/min. Temperatura del inyector: 200 °C, temperatura del detector: 250 °C, Carrier: helio.

Un método eficiente para la identificación de FAME basado en el análisis de los saltos en los ECL sobre un columna capilar fue descripto por Mjos,[12]. Se utilizan distintos programas de temperatura y presión, y las modificaciones en el ECL son analizados matemáticamente. Así se puede determinar la longitud de la cadena, el número de dobles enlaces, y las posiciones de los dobles enlaces.

Para los trabajo de rutina se utilizan mezclas de testigos comerciales (de Sigma, Matreya, Un-Chek-Prep, Larodan), pero también son útiles los extractos naturales de origen animal o vegetal (aceites de pescado o vegetales, testículos bovinos o de rata, cerebros bovinos o de rata) ya que la composición de sus ácidos grasos es conocida.

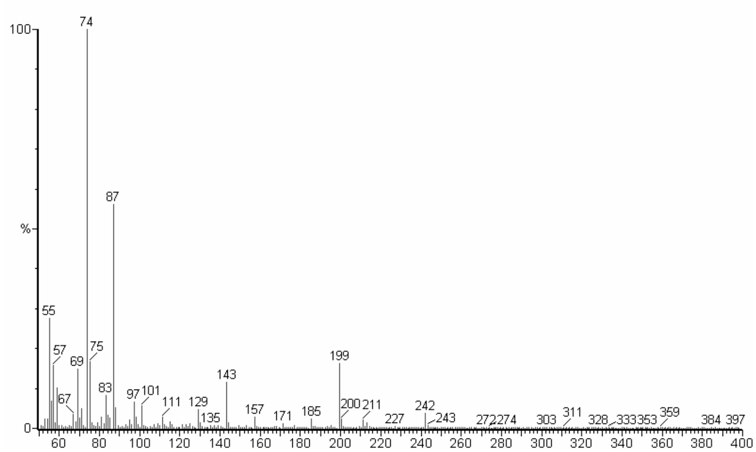
La combinación de la GC con un detector de espectrometría de masas es la mejor solución para el análisis de muestras que contengan AG inusuales. Sin embargo, el sistema de detección preferido en los análisis de rutina es el de ionización en llama (FID). Los detectores de conductividad térmica también se utilizaron en los primeros análisis de FAME, con resultados comparables a los obtenidos con FID, pero actualmente solo se utilizan en el análisis de muestras gaseosas.

La espectrometría de masas se ha convertido en una herramienta muy importante para la identificación de lípidos separados por cromatografía gaseosa. Un uso habitual de la espectrometría de masas es acoplada a cromatógrafos.

En el caso de la cromatografía gaseosa, la columna cromatográfica sale del horno del cromatógrafo y se introduce directamente en la cámara de ionización del espectrómetro, por medio de una línea de transferencia. Es allí, donde las moléculas en fase gaseosa, al salir de la columna, son bombardeadas por un haz de electrones de alta energía, provenientes de un filamento encendido entre dos electrodos. En general, la energía de ionización es de 70eV. Se forman iones con carga positiva, que se seguirán fragmentando de diferentes maneras para dar entidades cargadas mas pequeñas dando lugar finalmente a un haz iónico que será analizado en el filtro de masas, el cuadrupolo.

El cuadrupolo consta de cuatro barras redondas, conductoras de la electricidad, paralelas y equidistantes entre sí, sometidas a rápidos cambios de potencial eléctrico, de manera tal que los iones que pasan por el espacio central son forzados a describir una trayectoria helicoidal. El potencial aplicado, cuya componente alterna está en la banda de radiofrecuencia, es tal que todas las partículas con relación masa/carga fuera del rango que hayamos establecido no podrán pasar por el espacio central, y solo llegarán al detector las que nos interesan, describiendo una trayectoria helicoidal de diámetro constante. Las partículas cargadas que pasan a través del cuadrupolo llegarán al detector, que va a transformar el haz de iones en una señal eléctrica. Las mismas que viajan a alta velocidad impactan sobre una superficie metálica o dinodo de conversión que las transforma en electrones. Los electrones chocan sobre una lámina de fósforo y son transformados en fotones de luz. Estos fotones se dirigen al foto multiplicador, impactan en un primer dinodo que emite electrones que son multiplicados y acelerados de manera que impactan sobre un segundo y así sucesivamente. Los multiplicadores comerciales llegan a tener entre 10 y 14 dinodos, o sea que amplifican la señal hasta 10^6, ese flujo final de electrones se transforma en una señal eléctrica que puede ser además aumentada por amplificación común electrónica. Esta corriente eléctrica es después procesada y digitalizada para convertirse en lo que se conoce como cromatograma.

Las moléculas no se fragmentan arbitrariamente, sino que se fragmentan donde la unión es más lábil, por ejemplo las próximas a grupos funcionales o según ciertas reglas como el reordenamiento de Mc Lafferty.



Gráfica de la señal originada en el detector masa de un ácido graso.

Los FAME saturados son fácilmente identificados por espectrometría de masas por un ion molecular importante (M^+) más otros iones significativos correspondientes a M-31 (pérdida de metanol) o M-43 (pérdida de C2, C3 y C4 como resultado de un reordenamiento), conjuntamente con una serie de iones de fórmula general $[CH_3COO(CH_2)_n]$ frecuentemente con una intensidad máxima en 87, 143 y 199. El pico base, m/z=74, es llamado el ion del reordenamiento de McLafferty y se da por el clivaje de la molécula vecina al grupo carboxilo.

Cuantificación y expresión de los resultados

Aquellos que trabajen en GC con lípidos deben tener en cuenta que los detectores no poseen una respuesta lineal a la masa de AG. La respuesta del detector debe verificarse con una mezcla de estándares. Esta corrección es más importante en estudios relacionados a AG altamente insaturados.

El análisis cualitativo de los FAME presentes en la muestra en estudio, se realiza en base a sus diferentes tiempos de retención (t_r). El sistema de identificación por t_r está basado en la dependencia lineal entre el logaritmo del volumen de retención y el número de átomos de carbono homólogos (AG patrón) bajo las condiciones cromatográficas establecidas. Un parámetro que debemos definir es el tiempo de retención relativa. Este tiempo es la relación existente entre el t_r de cada uno de los ácidos grasos de la muestra con respecto al t_r de un estándar. Conviene destacar que si el instrumento dispone de un programa de integración automática, en los análisis de rutina con gran número de muestras a analizar, el t_r debe ir actualizándose debido al envejecimiento de la columna. Otro elemento que debemos considerar es el área de cada pico que es proporcional a la señal eléctrica y a su vez esta señal es proporcional a la concentración del analito. Por su parte, el análisis cuantitativo en GC se basa en la relación entre la masa y la respuesta del detector.

Los resultados cuantitativos son expresados generalmente como peso porcentual (normalización del área), esto es usado actualmente en los trabajos de nutrición. En estudios bioquímicos, como estructura de membrana, los resultados deben expresarse en base al porcentaje molar. Esta regla ha sido editada por Hildich en 1947 y se encuentra vigente hasta hoy. «La composición molar es más informativa que la composición porcentual en peso en la discusión de los hechos, porque ésta expresa los números relativos de moléculas de cada tipo de AG, o componente glicérido presente en la muestra. La diferencia en los dos modos de expresión se hace especialmente significativo cuando AG de muy diferentes pesos moleculares están presentes en la muestra. Así, por ejemplo, la presencia de 3% en peso de ácido butírico en la grasa de la manteca, en la realidad representa que de cada 100 moleculas de AG, aproximadamente 10 sean ácido butírico». Y esto de ninguna manera representa el 3%.

Una desventaja que tiene la normalización del área es la propagación del error: la fuerte interdependencia de los resultados. Así, si un ácido es erróneamente estimado (u omitido cuando es desconocido), también son afectados los resultados para los otros AG. Para reducir de alguna de alguna manera toda la

clase de errores, se recomienda el uso de un estándar interno (generalmente C 15:, C17:0 o C19:0). La medición de la incertidumbre debe expresarse de acuerdo a lo establecido por ISO o al estándar de EURACHEM/CITA «Guide Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement».

Otro de los parámetros que se debe definir en el análisis cuantitativo es el Factor de respuesta (Rf_{FAME}) que es la relación del área en el cromatograma del FAME estándar y su concentración molar ($Área_{FAME}$/mol FAME). Otro indicador que se genera es la relación de áreas con respecto al estándar interno (PAR) que es el área del FAME dividido el área del estándar interno. Debemos calcular también la relación de moles (MR) que son los mol del FAME sobre los mol del estándar interno. El parámetro que nos sirve para cuantificar es la relación molar relativa (RMR) que es el cociente entre el PAR y MR. Del trabajo de esta ecuación obtendremos la concentración de un AG graso desconocido en función de la concentración de su correspondiente patrón.

En aquellas ocasiones en que no se requiere de los valores de concentración de cada AG de la muestra, los resultados suelen expresarse en porcentaje de áreas (%). Para cada ácido, este método expresa el resultado del porcentaje relativo del AG frente al total de ácidos grasos.

Experimento 8: Determinación de la composición de ácidos grasos de un extracto lipídico de eritrocitos por cromatografía gaseosa

Drogas y reactivos:

Hexano, MetOH anhidro, NaOH, BF_3 MetOH 14 %, BHT, Estándares Sigma mix N° 189-2, 189-4, 189-13. Estándar interno: ácido Pent adecanoico (4 μMol/mL en hexano). Reactivo de transesterificación: 0,5 M NaOH en MetOH anhidro.

Preparación del MetOH anhidro: 500 mL de MetOH + 2,5 gr de limaduras de Mg + 0,1 gr de I_2. Hervir 1 hora a reflujo y luego destilar a 64,5 °C.

Materiales:

Tubos de extracción de vidrio con tapa a rosca y contratapa de Teflon, baño María, N_2 gaseoso.

Equipo: cromatógrafo gaseoso Perkin Elmer MS, equipado con columna Carbowax de 50 mts de long, Jeringa Hamilton.

Objetivos

a) Preparar metil ésteres de ácidos grasos (FAMEs) provenientes de un extracto lipídico de eritrocitos.

b) Separar e identificar los FAMEs por cromatografía gaseosa.

c) Cuantificar y determinar la composición porcentual de FAMEs en la muestra.

Técnica Operativa

1. Preparación de FAMEs: como se parte de un extracto lipídico crudo es importante realizar en primer término una transesterificación base-catalizada (NaOH/MetOH y en segundo término una esterificación con BF_3 MetOH).

    a. Colocar 1-2 mg de lípidos (100-200 μL provenientes del extracto lipídico) en tubo de extracción y 150 μL del estándar interno (0,6 μMol), evaporar bajo corriente de N_2.
    b. Agregar 1 mL del reactivo de transesterificación y homogeneizar en vortex. Colocar en baño María 15 min, retirar y dejar enfriar.
    c. Agregar 2 mL del reactivo BF_3 MetOH, homogeneizar en vortex y colocar en baño María 15 min, retirar y dejar enfriar.
    d. Agregar 2 mL de hexano, homogeneizar vigorosamente durante 3 minutos y colocar en baño María durante 5 min, retirar y dejar enfriar.
    e. Extraer la fase hexano. Llevar a sequedad bajo corriente de N_2, reconstituir en 100 μL con hexano BHT 0,05 %.

2. Separación de FAMEs por GC. Procedimiento

Una vez alcanzadas las condiciones óptimas de temperatura y estabilidad del instrumento se realizarán las siguientes inyecciones:

- Solvente utilizado (hexano)
- Antioxidante agregado a las muestras (BHT 0,05%)

- Estándar interno (metíl éster de ac. Pentadecanoico).
- Estándares de mezclas de distintos metil ésteres de ácidos grasos. Sigma Mix 189-2; 189-4; 189-13.
- Muestras provenientes de extractos lípidos de eritrocitos.
- Determinar la composición porcentual de FA de cada muestra y las concentraciones molares.
- En todos los casos se registrarán los tiempos de retención y el área de la integración de señal.

Ejemplo de cálculo:

Este ejemplo se desarrolla con la técnica utilizada en el experimento 8. Se utiliza el estándar interno C_{15}. Durante el desarrollo del cromatograma se determinarán los tiempos de retención (tr) para cada componente de los estándares de AG y de la muestra. A veces y con el fin de estandarizar los resultados puede ser conveniente calcular los tiempos de retención relativos al del estándar interno (trr), el que se calcula trr = tr ÷ tr C_{15}, de esta manera es posible identificar los picos normalizando el tiempo de retención al del estándar interno.

Una vez identificados los picos, obtendremos por integración los siguientes parámetros:

A_i = área de la muestra incógnita o de los estándares de AG

A_{C15} = área del estándar interno C_{15}

Conociendo las concentraciones del estándar interno y de los estándares de AG podemos definir los siguientes parámetros:

RMR = relación molar relativa

PAR = relación de áreas de picos

MR = relación molar

Siendo:

El parámetro RMR_i se debe calcular para cada estándar de AG, luego para la muestra incógnita el cálculo se realizará en base a los Ai y RMR_i obtenidos de la siguiente manera:

De la ecuación [1] podemos determinar que

$$RMR = \frac{PAR}{MR} \quad [1] \qquad Y \qquad \left. \begin{aligned} PAR &= \frac{A_i}{A_{C15}} \quad [2] \\ MR &= \frac{moles_i}{moles_{C15}} \quad [3] \end{aligned} \right\} RMR_i$$

$$MR = \frac{PAR}{RMR} \quad [4] \qquad\qquad MR = \frac{moles_i}{moles_{C15}} \quad [3]$$

luego de [4] y [3] se obtiene $$\frac{PAR}{RMR} = \frac{moles_i}{moles_{C15}} \quad [3]$$

finalmente para calcular los moles de la incógnita usamos la siguiente expresión:

$$moles_i = \frac{PAR}{RMR} \cdot moles_{C15} \quad [5]$$

Ejercicio: Se debe calcular la concentración molar de las siguientes muestras. Se inyecta 1 μL de cada testigo y muestra.

t_r	FA	189-4	189-1	189-2	189-5	189-15	Mta I	Mta II
3.577	BHT			2152	1180	1960	15905	37136
7.305	C14:0					10120		
9.598	C15:0	39241	7881	13560	13007	13127	11852	8989
11.27	C16:1	39668						
11.914	C16:0		9593	14566	12540		11298	17418
14.115	C17:0							
15.03	C18:4					18008		
15.451	C18:2		8753				3566	6570
15.524	C18:3		10098	11813			2789	
15.717	C18:1	42146	15125	16372			2851	4689
16.479	C18:0		13892	17932	13774		16314	21108
18.8	C20:5					12740		
18.841	C20:4					13099	13935	27141
20.047	C20:1	47336						
20.72	C20:0			18460	15050			
22.569	C22:6						2021	4046
22.907	C22:4					12433	1150	2251
24.098	C22:1	51971				15862		
24.74	C22:0				19056		820	985

Concentración de los testigos:

189-4. 14 nmol/ de cada estándar + 12 nmol/ de st interno.
189-1: 5 nmol/ de cada estándar + 4 nmol/ st interno
189-2: 8 nmol/ C16:0; 6 nmol/ C18:3 y C20: 5 nmol/ C18:1; 6,5 nmol/ C18:0+ 6 n/ st interno
189-5: 6,5 nmol/ C16:0; 5 nmol/ C18:0, C20:0 y C22:0 + 6 nmol/ st interno.
189-15: 6 nmol/ de cada testigo + 6 nmol/ de st interno.
Mta I: 5,2 nmol st interno.
Mta II: 4,6 nmol st interno.

189-4

FA	nmol	t_r	t_{rrel}	Area	PAR	MR	RMR
C15:0	12	9.598		39241			
C16:1	14	11.27	1,18	39668	1,01	1,17	0,87
C18:1	14	15.717	1,64	42146	1,07	1,17	0,92
C20:1	14	20.047	2,08	47336	1,21	1,17	1,03
C22:1	14	24.098	2,51	51971	1,32	1,17	1,14

189-1

FA	nmol	t_r	t_{rrel}	Area	PAR	MR	RMR
C15:0	5	9.598		7881			
C16:0	4	11.914	1,24	9593	1,22	1,25	0,97
C18:2	4	15.451	1,61	8753	1,11	1,25	0,89
C18:3	4	15.524	1,62	10098	1,28	1,25	1,03
C18:1	4	15.717	1,64	15125	1,92	1,25	1,54
C18:0	4	16.479	1,72	13892	1,76	1,25	1,41

189-2

FA	nmol	t_r	t_{rrel}	Area	PAR	MR	RMR
C15:0	6	9.598		13560			
C16:0	8	11.914	1,24	14566	1,07	1,33	0,81
C18:3	6	15.524	1,62	11813	0,87	1,00	0,87
C18:1	6.5	15.717	1,64	16372	1,21	1,08	1,11
C18:0	5	16.479	1,72	17932	1,32	0,83	1,59
C20:0	6	20.72	2,16	18460	1,36	1,00	1,36

189-5

FA	nmol	t_r	t_{rrel}	Area	PAR	MR	RMR
C15:0	6	9.598		13007			
C16:0	6.5	11.914	1,61	12540	0,96	1,08	0,89
C18:0	5	16.479	1,72	13774	1,06	0,83	1,27
C20:0	5	20.72	2,16	15050	1,16	0,83	1,39
C22:0	5	24,74	2,58	19056	1,47	0,83	1,76

189-15

FA	nmol	t_r	t_{rrel}	Area	PAR	MR	RMR
C15:0	6	9.598		13127			
C14:0	6	7.305	0,76	10120	0,77	1	0,77
C18:4	6	15.03	1,57	18008	1,37	1	1,37
C20:5	6	18.8	1,96	12740	0,97	1	0,97
C20:4	6	18.841	1,96	13099	1,00	1	1,00
C22:4	6	22.907	2,18	12433	0,95	1	0,95
C22:1	6	24.098	2,51	15862	1,21	1	1,21

Mta I

FA	nmol	t_r	t_{rrel}	Area	PAR	MR	RMR
C15:0	5,2	9,6		11852			
C16:0	**6,12**	11,914	1,24	11298	0,95		**0,81**
C18:2	**1,76**	15,451	1,61	3566	0,30		**0,89**
C18:3	**1,19**	15,524	1,62	2789	0,24		**1,03**
C18:1	**0,81**	15,717	1,64	2851	0,24		**1,54**
C18:0	**5,08**	16,479	1,72	16314	1,38		**1,41**
C20:4	**6,11**	18,841	1,96	13935	1,18		**1**
C22:6		22,569	2,35	2021	0,17		
C22:4	**0,53**	22,907	2,39	1150	0,10		**0,95**
C22:0	**0,2**	24,74	2,58	820	0,07		**1,76**

Referencias Bibliográficas

1. LIU, Z., PATTERSON, D.G. Jr., NEEDHAM, L.L. Comprehensive two-dimensional gas chromatography for the fast separation and determination of pesticides extracted from human serum. *Anal. Chem.* 1994 66: 3088-3092.
2. MORRISON, W.R., SMITH, L.M. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boronfluonde-methanol. *J. Lipid Res.* 1964, 5; 600-610
3. SUKHIJA, P.S., PALMUIST, D.L. Rapid method for determination of total fatty acid content and composition of feedstuffs and feces. *J. Agric. Food Chem.* 1988 36: 1202–1206.
4. ICHIHARA, K., SHIBAHARA, A., YAMAMOTO, K., NAKAYAMA, T. An improved method for rapid analysis of the fatty acids of glycerolipids. *Lipids* 1996 31:535-9.
5. DESTAILLATS, F., ANGERS, P. Base-catalyzed derivatization methodology for FA analysis. application to milk fat and celery seed lipid TAG. *Lipids* 2002 37: 527-532.
6. PIRETTI, M.V., PAGLIUCA, G., VASINA, M. Transmethylation of neutral and polar lipids with NaBH4 in the presence of NaOH. *Chem. Phys. Lipids* 1988 47: 149-153
7. WOO, K.L., KIM, J.I. New hydrolysis method for extremely small amount of lipids and capillary gas chromatographic analysis as N(O)-tert.-butyldimethylsilyl fatty acid derivatives compared with methyl ester derivatives. *J. Chromatogr. A* 1999 862: 199-208.
8. MYHER, J.J, KUKSIS, A. General strategies in chromatographic analysis of lipids. *J. Chromatogr B.* 1995 671: 3-33.
9. THOMPSON, R. H. Simplifying fatty acid analyses in multicomponent foods with a standard set of isothermal GLC conditions coupled with ECL determinatios. *J. Chromatogr Sci.* 1996 34: 495-504.

10. JENNINGS, W., MITTLEFEHLDT, E., STREMPLE, P. Analytical gas chromatography, 2nd *Ed. Acad Press, New York, 1987.* Analytical Gas pp 1-28.
11. ACKMAN, R.G. The analysis of fatty acids and related materials by gas-liquid chromatography. *Prog. Chem. Fats and other Lipids 1972 12: 165-284.*
12. MJOS, S.A. Identification of fatty acids in gas chromatography by application of different temperature and pressure programs on a single capillary column. *J Chromatogr A* 2003 1015: 151-159.
13. HILDITCH, T.P. The chemical constitution of natural fats, Chapman et Hall Ltd, 1947*,* pp 464.

Indice Alfabético

ANÁLISIS DE LÍPIDOS DE BIOMEMBRANAS

Procesado Gráfico Integral
UNR EDITORA
EDITORIAL DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO
Secretaría de Extensión Universitaria

Urquiza 2050 (S2000AOB) Rosario - Santa Fe - República Argentina
www.unreditora.unr.edu.ar
editora@sede.unr.edu.ar
Edición de 300 ejemplares
JULIO 2008